

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



## TESIS DOCTORAL

Estudio del papel del péptido antagonista de TGF- $\beta$ 1, P17, en el desarrollo de estenosis traqueal en un modelo animal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Iván Martínez Serna

DIRECTORES

Juan Luis Antón-Pacheco Sánchez  
Antonio Pablo Gámez García

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

ESTUDIO DEL PAPEL DEL PÉPTIDO ANTAGONISTA DE TGF- $\beta$ 1, P17, EN EL  
DESARROLLO DE ESTENOSIS TRAQUEAL EN UN MODELO ANIMAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

IVÁN MARTÍNEZ SERNA

DIRECTOR

JUAN LUIS ANTÓN-PACHECO SÁNCHEZ

ANTONIO PABLO GÁMEZ GARCÍA

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL PAPEL DEL PÉPTIDO  
ANTAGONISTA DE TGF- $\beta$ 1, P17, EN EL  
DESARROLLO DE ESTENOSIS TRAQUEAL EN UN  
MODELO ANIMAL**

Iván Martínez Serna

**Directores:**

Dr. Juan Luis Antón-Pacheco Sánchez  
Dr. Antonio Pablo Gámez García

**Tutor:**

Prof. Felipe de la Cruz Vigo

Madrid 2020

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Este trabajo se ha realizado gracias a una beca otorgada por el Instituto de Salud Carlos III cuyo código de identificación es PI12/00646.

A mi padre y mi hermana, Herminio y Vanessa

A mi esposa Julia

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar agradeciendo a todas aquellas personas sin las cuales éste trabajo no hubiera sido posible. De manera directa o indirecta, su apoyo y confianza han hecho que se pueda reflejar en ésta tesis todo el esfuerzo dedicado a ella.

Al Dr. Juan Antón-Pacheco, que en su día me brindó la oportunidad de entrar en este apasionante estudio y por su apoyo y confianza en todo momento para que ésta tesis saliera adelante. Gracias también al Dr. Pablo Gámez por su ayuda, ya no sólo en este trabajo sino desde mi inicio como residente en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital 12 de Octubre hasta hoy y por inculcarnos siempre la idea de no conformarnos y la perseverancia de insistir hasta alcanzar nuestras metas, una de ellas, la consecución del grado de Doctor. Al Dr. Felipe de la Cruz por su inestimable ayuda en este camino, su orientación y sabio consejo durante todo el proceso.

A Alicia Usategui, por su paciencia infinita y su inmensa ayuda de manera desinteresada, imposible de cuantificar. También a Monserrat Grau y a toda la gente del quirófano experimental del Instituto i+12 por su esfuerzo y dedicación impagables.

A todos mis compañeros del staff del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario 12 de Octubre que han participado en mi formación y que han conseguido que sea el cirujano torácico que soy hoy, de lo cual me siento orgulloso. También a todos los residentes con los que he podido coincidir durante mi etapa formativa y de adjunto, porque ellos también me han enseñado mucho, desde el punto de vista clínico y personal.

A mi familia, a mi padre y mi hermana, que siempre han estado ahí a pesar de las dificultades que la vida nos ha ido poniendo en el camino.

Y por supuesto a mi esposa Julia, apoyo fundamental en mi vida y también en esta tesis.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>1. LA TRÁQUEA: CARACTERÍSTICAS.....</b>	<b>20</b>
1.1. EMBRIOLOGÍA DEL APARATO RESPIRATORIO.....	20
1.2. ANATOMÍA DE LA TRÁQUEA .....	21
1.3. CITOHISTOLOGÍA .....	26
1.4 FISIOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LA VÍA AÉREA CENTRAL .....	28
<b>2. ESTENOSIS TRAQUEAL BENIGNA.....</b>	<b>31</b>
2.1. CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA .....	31
2.1.1. Estenosis traqueal idiopática.....	31
2.1.2. Estenosis traqueal secundaria a inflamación local .....	32
2.1.2.1. Estenosis traqueal postintubación .....	32
2.1.2.2. Estenosis traqueal postraqueostomía.....	34
2.1.3 Estenosis traqueal secundaria a enfermedades sistémicas inflamatorias crónicas.....	35
2.1.3.1. Estenosis traqueobronquial en la amiloidosis .....	35
2.1.3.2. Estenosis traqueobronquial en sarcoidosis .....	35
2.1.3.3. Estenosis traqueobronquial en la policondritis recidivante .....	36
2.1.4. Estenosis traqueal secundaria a enfermedades del colágeno- vasculitis: Enfermedad de Wegener.....	36
2.1.5. Estenosis traqueobronquial de origen infeccioso: Tuberculosis.....	37
2.1.6. Miscelánea: otras estenosis traqueales .....	37
2.1.6.1. Traqueobroncopatía osteocondroplástica.....	37
2.1.6.2. Compresiones traqueales extrínsecas.....	38
2.1.6.3. Lesiones por agentes químicos .....	38
2.2. ESTENOSIS TRAQUEAL EN LA EDAD PEDIÁTRICA .....	39
2.2.1. Estenosis traqueal adquirida y estenosis subglótica .....	39
2.2.2. Estenosis traqueal congénita .....	40
<b>3. ESTENOSIS TRAQUEAL BENIGNA: DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>42</b>
3.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	42
3.2. EXPLORACIONES DIAGNÓSTICAS .....	43
3.2.1. Broncoscopia. ....	43
3.2.2. Pruebas de imagen. ....	44



<b>4. ESTENOSIS TRAQUEAL: TRATAMIENTO .....</b>	<b>46</b>
4.1. TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO .....	47
4.1.1. Antecedentes históricos de la broncoscopia .....	47
4.1.2. Técnicas broncoscópicas terapéuticas.....	48
4.1.2.1. Dilatación neumática .....	48
4.1.2.2. Endoprótesis.....	52
4.1.2.3. Terapia laser.....	60
4.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA ESTENOSIS TRAQUEAL .....	65
4.2.1. Antecedentes históricos de la cirugía traqueal .....	65
4.2.2. Técnicas quirúrgicas .....	67
4.2.2.1. Generalidades .....	67
4.2.2.2. Procedimientos e indicaciones .....	69
4.2.2.2.1. ESTENOSIS TIPO I .....	69
4.2.2.2.2. ESTENOSIS TIPO II. OPERACIÓN DE PEARSON .....	70
4.2.2.2.3. ESTENOSIS TIPO III. OPERACIÓN DE GRILLO.....	71
4.2.2.2.4. ESTENOSIS TIPO IV. OPERACIÓN DE MADDAUS Y PEARSON .....	73
4.2.2.2.5. ESTENOSIS SUBGLÓTICAS COMPLEJAS CON AFECTACIÓN EXTENSA DEL CRICOIDES Y SU MUCOSA. OPERACIÓN DE COURAUD .....	74
4.2.2.3. Complicaciones de la cirugía laringotraqueal .....	75
4.2.2.3.1. Complicaciones relacionadas con la anastomosis .....	76
4.2.2.3.2. Complicaciones no anastomóticas.....	79
<b>5. PAPEL DEL TGF-<math>\beta</math> EN EL DESARROLLO DE LA ESTENOSIS TRAQUEAL INFLAMATORIA .....</b>	<b>81</b>
5.1. GENERALIDADES DEL TGF- $\beta$ . VIA DE SEÑALIZACIÓN. ....	81
5.2. FUNCIONES DEL TGF- $\beta$ .....	85
5.2.1. Fibrosis y cicatrización .....	86
5.2.2. Regulación del ciclo celular.....	87
5.2.3. Regulación del sistema inmune.....	88
5.2.4. Supresión tumoral/oncogénesis en cáncer humano.....	89
5.2.5. Progresión tumoral .....	90
5.3. VIA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT .....	90
<b>6. HIPOTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>97</b>
<b>7. OBJETIVOS.....</b>	<b>99</b>

<b>8. DISEÑO DEL ESTUDIO. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>101</b>
8.1. DECLARACIÓN ÉTICA .....	101
8.2. MODELO ANIMAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL .....	101
8.2.1. Efecto de p17 en el modelo de estenosis traqueal.....	105
8.2.2. Efecto de Baricitinib en el modelo de estenosis traqueal .....	107
8.3. PACIENTES .....	108
8.4. METODOS HISTOLÓGICOS .....	108
8.4.1. Tinciones histológicas .....	108
8.4.1.1. Evaluación histológica del contenido de colágeno traqueal....	109
8.4.1.2. Evaluación histológica de la estructura del cartílago traqueal	110
8.4.2. Inmunodetección .....	110
8.4.2.1. Inmunoperoxidasa .....	111
8.5. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DATOS IHC .....	114
8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	114
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>116</b>
9.1. ESTUDIO DEL TEJIDO TRAQUEOBRONQUIAL DE PACIENTES CON ESTENOSIS TRAQUEAL .....	116
9.2. INDUCCIÓN DE ESTENOSIS TRAQUEAL EN UN MODELO ANIMAL .....	120
9.2.1. Análisis de la luz traqueal en el modelo animal de estenosis traqueal .....	121
9.2.2. Análisis histopatológico del tejido traqueal en el modelo animal de estenosis traqueal .....	122
9.2.3. Determinación IHC de la expresión de $\alpha$ -SMA y CTGF en el tejido traqueal .....	125
9.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DE P17 SOBRE MUESTRAS ANIMALES DEL MODELO DE ESTENOSIS TRAQUEAL.....	127
9.3.1. Análisis de la luz traqueal.....	127
9.3.2. Análisis del colágeno submucoso .....	128
9.3.3. Análisis de la expresión de $\alpha$ -SMA.....	130
9.3.4. Evaluación de la estructura del cartílago del tejido traqueal en el modelo animal.....	133
9.4. ESTUDIO DE LA VÍA JAK-STAT EN LA ESTENOSIS TRAQUEAL....	135
9.4.1. Estudio de la expresión de p-STAT-3 en el tejido traqueobronquial de pacientes con estenosis traqueal y en el modelo animal .....	135
9.4.2. Efecto del tratamiento con Baricitinib sobre el modelo animal de estenosis traqueal. ....	137

<b>10. DISCUSION .....</b>	<b>140</b>
10.1. PAPEL DEL TFG- $\beta$ EN LA ESTENOSIS TRAQUEAL DE ORIGEN INFLAMATORIA .....	141
10.1.1. Análisis del depósito de matriz colágena. ....	143
10.1.2. Análisis de celularidad $\alpha$ -actina positiva.....	144
10.1.3. Análisis de presencia de CTFG.....	145
10.1.4. Análisis de presencia de p-SMAD2/3.....	147
10.2. MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL .....	149
10.3. P17 COMO INHIBIDOR DE TGF- $\beta$ SOBRE EL MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL .....	152
10.3.1. Factores con posible influencia sobre los resultados .....	155
10.3.1.1. Vía de administración de p17 .....	155
10.3.1.2. Dosis y concentración de p17 .....	156
10.3.1.3. Otras moléculas y vías moleculares .....	157
10.3.1.4. Otras vías moleculares: VEGF y edema submucoso .....	160
10.3.1.5. Transición epitelio mesénquima .....	162
10.3.1.6. Autofagia celular .....	162
10.3.2. Evaluación de la estructura del cartílago del tejido traqueal en el modelo animal.....	163
10.4. ANÁLISIS DE BARICITINIB COMO INHIBIDOR DE JAK/STAT SOBRE EL MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL.....	165
10.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	167
<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>170</b>
<b>12. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>172</b>
<b>13. ANEXO.....</b>	<b>211</b>
13.1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	211
13.2. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	214
13.3. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS .....	216

## RESUMEN

TITULO DE LA TESIS: ESTUDIO DEL PAPEL DEL PÉPTIDO ANTAGONISTA DE TGF- $\beta$ 1, P17, EN EL DESARROLLO DE ESTENOSIS TRAQUEAL EN UN MODELO ANIMAL

Fundamento y objetivos: La estenosis traqueal adquirida benigna de origen inflamatorio es un problema con gran impacto sobre la calidad de vida para el paciente adulto y pediátrico, en ocasiones con necesidad de traqueostomía permanente o tratamientos recurrentes de por vida. Aunque en la actualidad existen diversas opciones terapéuticas todas ellas presentan limitaciones y por el momento no se han desarrollado tratamientos basados en su fundamento fisiopatológico. Es conocido el papel relevante de diversos agentes moleculares implicados en los procesos de fibrosis y cicatrización siendo el TGF- $\beta$  uno de más importantes y también la activación de la vía intracelular JAK/STAT.

Los objetivos fundamentales de esta tesis son comprobar el papel de TGF- $\beta$  y la activación de la vía JAK/STAT en la fisiopatología de la estenosis traqueal inflamatoria humana y en animal de experimentación, mediante la obtención y validación de un modelo experimental estenosis traqueal con el fin de evaluar el potencial antifibrótico de la aplicación local del péptido P17, como antagonista de TGF- $\beta$ 1 y de Baricitinib, como inhibidor de la vía JAK/STAT

Material y métodos:

Se ha desarrollado un modelo de estenosis traqueal en conejo albino neocelandés adulto mediante lesión térmica circunferencial de la mucosa y extracción del bloque traqueal a la cuarta semana tras la intervención. Las

muestras obtenidas se compararon con muestras de tejidos traqueobronquiales humanos obtenidas por escisión de lesiones estenóticas durante intervención terapéutica electiva de 7 pacientes con estenosis traqueal inflamatoria benigna de origen adquirido y 9 controles sanos. Se analizó el grado de fibrosis mediante la tinción Tricrómica de Masson, la presencia de miofibroblastos  $\alpha$ -actina +, CTGF y p-SMAD 2/3 como marcadores subrogados de la acción de TGF- $\beta$ .

En una segunda fase, se analizó el potencial efecto de P17 como inhibidor de TGF- $\beta$  sobre el modelo de estenosis traqueal. Se tomó una población de 40 conejos a los que se les realizó el modelo de estenosis traqueal. Se les colocó una esponja peritraqueal de lipogel en la que se incorporó en 20 de ellos el péptido antagonista de TGF- $\beta$ 1 P17 y en otros 20 un vehículo salino. Tras la extracción del bloque traqueal a las 4 semanas se analizó el grado de fibrosis mediante la tinción Tricrómica de Masson, la presencia de miofibroblastos  $\alpha$ -actina + y CTGF como marcadores subrogados de la acción de TGF- $\beta$  así como el grado de luz traqueal.

Finalmente se ha propuesto analizar el potencial antifibrotico de Baricitinib como inhibidor de la vía JAK/STAT. Previamente se analizó la presencia de STAT-3 fosforilada y por tanto activada (p-STAT) en las muestras humanas y de estenosis traqueal del modelo experimental. Posteriormente se tomó una población de 12 conejos a los que se les realizó el modelo de estenosis traqueal. 6 de ellos recibieron un tratamiento con Baricitinib por vía oral a dosis de 20mg/día en 2 ml de metilcelulosa 0,5% y los otros 6 recibieron 2 ml de metilcelulosa 0,5% como control. El tratamiento se inició al tercer día tras la realización del modelo de estenosis traqueal y se administró a ambos grupos

durante 14 días. Finalizado el tratamiento, tras otros 14 días (duración total del ensayo 28 días), se procedió al sacrificio del animal y a la extracción del bloque.

Resultados: Las muestras de estenosis traqueal humana (pacientes n=7, controles sanos n=9) mostraron una mayor presencia a nivel submucoso de células  $\alpha$ -SMA+ (p=0.022), CTGF (p=0.0002) y p-SMAD 2/3 (p=0.0075) así como mayor colágeno submucoso (Masson) pero sin significación estadística (p=0.08), en comparación con los controles sanos. El modelo animal propuesto desarrolló unos hallazgos superponibles a los hallados en humano con mayor presencia de colágeno submucoso (p=0.007), mayor presencia de células  $\alpha$ -SMA+ (p<0.01) y CTGF (p<0.01).

En el análisis del efecto de P17 (34 animales: P17 n=19, control n=15), se observó una disminución del colágeno submucoso (p<0.01), disminución de células  $\alpha$ -SMA+ (p<0.01) y CTGF (p<0.001) así como un aumento en la luz traqueal pero sin conseguir significación estadística en los animales que recibieron p17 respecto a los controles. El estudio del cartílago traqueal no mostró diferencias en grosor o densidad entre ambos grupos.

También se observó un aumento de la activación de la vía JAK/STAT en las muestras de estenosis traqueal humanas (p=0.0007) y de animal de experimentación (n.s.) respecto a los controles. En el análisis del efecto de Baricitinib, no se observaron diferencias en cuanto a porcentaje de luz traqueal, porcentaje de área de colágeno y engrosamiento traqueal (p= 0.6753, p=0.8745, p=0.8745 respectivamente) entre los animales que recibieron Baricitinib y los controles.

Conclusiones: El TFG- $\beta$  desarrolla un papel relevante en la fisiopatología de la estenosis traqueal benigna de origen inflamatorio, en humano y animal de experimentación, objetivado por la sobreexpresión de los marcadores subrogados de actividad de TFG- $\beta$ : p-SMAD 2/3, CTGF y  $\alpha$ -SMA. Igualmente se observa una activación de la vía JAK/STAT en estenosis traqueal humana y de animal de experimentación.

El modelo animal propuesto reproduce dichos cambios histopatológicos y moleculares de estenosis traqueal inflamatoria mediados por TFG- $\beta$  y JAK/STAT observadas en el humano constituyendo un modelo preclínico válido para probar el impacto de antagonistas de éstas moléculas.

El tratamiento con el antagonista de TGF- $\beta$  P17 redujo significativamente la fibrosis submucosa, la celularidad miofibroblástica y la presencia de CTGF pero no incrementó significativamente la luz traqueal en éste modelo de estenosis traqueal postinflamatoria ni tampoco produjo mejorías significativas en cuanto a la disminución de grosor y densidad del cartílago traqueal.

El tratamiento con un inhibidor selectivo de JAK/STAT, Baricitinib, no mostró cambios en cuanto a porcentaje de luz traqueal, porcentaje de área de colágeno y engrosamiento traqueal en la estenosis traqueal de animal de experimentación.

*Palabras clave: modelo animal/ P17/ Factor de Crecimiento Transformante beta/ estenosis traqueal*

Background and objectives: Benign acquired inflammatory tracheal stenosis is a problem with great impact on quality of life for the adult and pediatric patient, sometimes in need of permanent tracheostomy or recurrent lifelong treatments. Although there are currently various therapeutic options, all of them have limitations and, at the moment, no treatments have been developed based on their pathophysiological basis. The relevant role of various molecular agents involved in fibrosis and healing processes is well known, with TGF- $\beta$  being one of the most important and also the activation of the intracellular JAK/STAT pathway.

The main objectives of this thesis are to verify the role of TGF- $\beta$  and the activation of the JAK/STAT pathway in the pathophysiology of human inflammatory tracheal stenosis and in experimental animals, by obtaining and validating an experimental model of tracheal stenosis in order to evaluate the antifibrotic potential of the local application of the P17 peptide, as an antagonist of TGF- $\beta$ 1 and Baricitinib, as an inhibitor of the JAK/STAT pathway.

Material and methods: an adult New Zealander albino rabbit model of tracheal stenosis was developed through circumferential mucosal thermal injury and removal of the tracheal block at the fourth week after the intervention. The samples obtained were compared with human tracheobronchial tissue samples obtained by excision of stenotic lesions during elective therapeutic intervention from 7 patients with acquired benign inflammatory tracheal stenosis and 9 healthy controls. The degree of fibrosis was analyzed using Masson's Trichrome stain, the presence of  $\alpha$ -actin+ myofibroblasts, CTGF and p-SMAD 2/3 as surrogate markers of TGF- $\beta$  action.



In a second phase, the potential effect of P17 as a TGF- $\beta$  inhibitor on the tracheal stenosis model was analyzed. A population of 40 rabbits was taken and the tracheal stenosis model was performed. A lipogel peritracheal sponge was placed in which 20 of them incorporated the TGF- $\beta$ 1 P17 antagonist peptide and in 20 others a saline vehicle. After removal of the tracheal block at 4 weeks, the degree of fibrosis was analyzed using Masson's Trichrome stain, the presence of  $\alpha$ -actin + myofibroblasts and CTGF as surrogate markers of TGF- $\beta$  action as well as the degree of tracheal lumen.

Finally, it has been proposed to analyze the antifibrotic potential of Baricitinib as an inhibitor of the JAK/STAT pathway. Previously, the presence of phosphorylated and therefore activated (p-STAT) STAT-3 was analyzed in the human and tracheal stenosis samples of the experimental model. Subsequently, a population of 12 rabbits was taken and the tracheal stenosis model was performed. 6 of them received treatment with Baricitinib orally at a dose of 20mg/day in 2 ml of methylcellulose 0.5% and the other 6 received 2 ml of methylcellulose 0.5% as a control. Treatment was started on the third day after performing the tracheal stenosis model and was administered to both groups for 14 days. After the treatment, after another 14 days (total duration of the trial 28 days), the trachea was removed.

Results: Human tracheal stenosis samples (patients n=7, healthy controls n=9) showed a higher presence at the submucosal of  $\alpha$ -SMA+ cells (p=0.022), CTGF (p=0.0002) and p-SMAD 2/3 (p=0.0075) as well as higher submucosal collagen (Masson) but without statistical significance (p=0.08), compared to healthy controls. The proposed animal model developed findings are similar to those found in humans with a higher presence of submucosal collagen (p=0.007),

higher presence of  $\alpha$ -SMA+ cells ( $p<0.01$ ) and CTGF ( $p<0.01$ ). In the analysis of the effect of P17 (34 animals: P17  $n=19$ , control  $n=15$ ), a decrease in submucosal collagen ( $p<0.01$ ), decrease in  $\alpha$ -SMA+ cells ( $p<0.01$ ), and CTGF ( $p<0.001$ ) as well as an increase in tracheal lumen but without obtaining statistical significance in the animals that received p17 compared to the controls. The tracheal cartilage study did not show differences in thickness or density between the two groups.

An increase in the activation of the JAK/STAT pathway was also observed in human tracheal stenosis samples ( $p=0.0007$ ) and experimental animal samples (n.s.) compared to controls. In the analysis of the effect of Baricitinib, no differences were observed in terms of tracheal lumen percentage, percentage of collagen area and tracheal thickening ( $p=0.6753$ ,  $p=0.8745$ ,  $p=0.8745$  respectively) between the animals that received Baricitinib and the controls.

Conclusions: TFG- $\beta$  plays a relevant role in the pathophysiology of benign tracheal stenosis of inflammatory origin, in humans and experimental animals, as evidenced by the overexpression of surrogate markers of TFG- $\beta$  activity: p-SMAD 2/3, CTGF and  $\alpha$ -SMA. Likewise, an activation of the JAK / STAT pathway is observed in human and experimental animal tracheal stenosis.

The proposed animal model reproduces histopathological and molecular changes of inflammatory tracheal stenosis mediated by TFG- $\beta$  and JAK / STAT observed in humans, constituting a valid preclinical model to test the impact of antagonists of these molecules.

Treatment with the TGF- $\beta$  antagonist, P17, significantly reduced submucosal fibrosis, myofibroblastic cellularity and CTGF expression, but it did not significantly increase the tracheal lumen in this model of post-inflammatory

tracheal stenosis, nor did it produce significant improvements in terms of thickness and density of the tracheal cartilage.

Treatment with a selective JAK / STAT inhibitor, Baricitinib, showed no changes in percentage of tracheal lumen, percentage of collagen area, and tracheal thickening in tracheal stenosis in experimental animals.

*Keywords: animal model/ P17/ Transforming Growing Factor beta/tracheal stenosis*

## **Introducción**

## **1. LA TRÁQUEA: CARACTERÍSTICAS**

### **1.1. EMBRIOLOGÍA DEL APARATO RESPIRATORIO**

El desarrollo del aparato respiratorio tiene lugar en la cuarta semana de gestación con la aparición del divertículo respiratorio (esbozo pulmonar). Este consiste en una invaginación de la pared ventral del intestino anterior por lo que el epitelio de revestimiento interno de la laringe, la tráquea y los bronquios tiene origen endodérmico mientras que los componentes cartilaginoso y muscular proceden del mesodermo esplácnico circundante al intestino anterior<sup>1</sup>. El esbozo pulmonar contacta ampliamente con el intestino anterior pero cuando el divertículo respiratorio se extiende caudalmente aparecen dos rebordes longitudinales (rebordes traqueoesofágicos) que al fusionarse dan lugar al tabique traqueoesofágico separando así la invaginación del intestino anterior en una porción dorsal, el esófago, y una porción ventral, la tráquea y los esbozos pulmonares. La separación completa de la tráquea y el esófago se produce alrededor de la sexta semana de gestación. En el curso de su separación del intestino anterior, el primordio respiratorio forma una estructura sobre la línea media, la tráquea, y dos invaginaciones laterales, las yemas o esbozos bronquiales. El primordio respiratorio sigue manteniendo la comunicación con la faringe a través del orificio laríngeo en su porción más craneal. El orificio laríngeo, inicialmente como una hendidura sagital, adquiere forma de T. Del mesénquima del IV y VI arcos faríngeos derivan los componentes cartilaginosos que al fusionarse conforman el cartílago tiroides, cricoides, aritenoides, corniculado o de Santorini y cuneiforme o de Wrisberg. Posteriormente, cuando el mesénquima de dichos arcos faríngeos conforma el cartílago tiroides,

cricoides y aritenoides se aprecia la forma característica del orificio laríngeo adulto<sup>1</sup>. El epitelio laríngeo de origen endodérmico prolifera rápidamente provocando una oclusión temporal de la luz que posteriormente, tras un proceso de vacuolización y recanalización, forma un par de cavidades laterales, los ventrículos laríngeos. Estos espacios están limitados por pliegues de tejido que se convertirán en las cuerdas vocales verdaderas y falsas. Los músculos laríngeos derivados del IV y VI arcos faríngeos están inervados por el nervio laríngeo superior y el nervio laríngeo recurrente, respectivamente, ambas ramas proceden del décimo par craneal, el nervio vago.

## **1.2. ANATOMÍA DE LA TRÁQUEA**

La tráquea es un órgano fibrocartilaginoso en forma de cilindro hueco que conecta la laringe desde el cartílago cricoides a nivel de la sexta vértebra cervical hasta la carina o bifurcación bronquial a nivel de la cuarta o quinta vertebra torácica (disco intervertebral T4-5)<sup>2</sup>. La tráquea normal desciende a nivel de la línea cervical y del tercio superior del mediastino medio. En una visión lateral la tráquea se desplaza anteroposteriormente pasando desde la porción subcutánea a nivel de la tráquea cervical inmediatamente por debajo del cricoides hasta la tráquea torácica y carina que se sitúan anterior al esófago. Aunque hay una gran variación individual, el ángulo de la tráquea con respecto a la vertical en el plano sagital se incrementa gradualmente con la edad y con la cifosis de la columna vertebral pudiendo aproximarse en los casos severos a una posición trasversa. La posición de la tráquea también varía con la flexoextensión cervical, la respiración y la deglución, y con factores individuales como los ya citados, edad y curvatura de la columna vertebral, diámetro anteroposterior del tórax y

constitución física<sup>2</sup>. Se podría considerar que en la edad pediátrica, 3/5 de la longitud traqueal se sitúan por encima de la escotadura supraesternal, en la edad adulta la porción de traqueal por encima de la escotadura sería la mitad y un tercio o menos en el anciano. En los dos primeros grupos la proporción de tráquea cervical varía especialmente con la extensión y la flexión cervical.

La tráquea está formada por 18 a 24 anillos cartilaginosos incompletos en su parte posterior en forma de C, pudiendo ser algunos de ellos bífidos o unirse frecuentemente a los cartílagos adyacentes. Los cartílagos están unidos entre sí de manera vertical por láminas fibroelásticas llamadas ligamentos anulares. La parte posterior de la tráquea está formada por la capa membranosa que comprende un tercio, un cuarto en la edad pediátrica, de la circunferencia traqueal, unida a los extremos de los cartílagos traqueales. Las fibras musculares del músculo traqueal se sitúan en esta capa membranosa en situación trasversal y se insertan en los extremos de los cartílagos traqueales a modo de lámina continua de fibras musculares lisas de 1 o 2 mm de grosor<sup>2</sup>.

La longitud de una tráquea adulta se cifra sobre los 11.8 cm con un rango variable entre los 10 y 13-14 cm desde el borde inferior del cartílago cricoides hasta la parte superior de la carina traqueal. La longitud adulta media es de 12 cm en el varón y 11 cm en la mujer, aunque puede variar con la edad o flexoextensión cervical<sup>2</sup>. La altura de un anillo es aproximadamente 4mm variando entre 2 y 5 mm por lo que un centímetro traqueal comprende alrededor de dos anillos. La pared traqueal mide sobre los de 3 mm de grosor. La tráquea está dotada de cierta flexibilidad aunque su extensibilidad longitudinal está

limitada, estimándose en un 10% siendo mayor en el niño. Elasticidad y flexibilidad se ven limitadas con la edad avanzada, sobre todo relacionada con la calcificación de los cartílagos traqueales. La tráquea está fijada por el arco aórtico sobre el bronquio principal izquierdo donde se produce relativamente poco movimiento deslizante. Con el aumento del diámetro anteroposterior del tórax con la edad, relacionado con la cifosis vertebral, este punto de fijación atrae a la carina más adelante y la tráquea tiene una posición más horizontal cuando se ve lateralmente.

En el varón adulto el diámetro externo de la tráquea es alrededor de 2,3 a 2,5cm en sentido coronal y 1,8 cm medido en sentido sagital. En el neonato tiene un diámetro aproximado de 0,5 cm. En la mujer se estima en 2 cm y 1,4 cm respectivamente<sup>2</sup>. La forma del cilindro traqueal no es regular sino que está ligeramente aplanada transversalmente en su parte superior y anteroposteriormente en su parte más inferior. El área transeccional de la tráquea así como su forma endoluminal cambian también de manera dinámica con los cambios de presión intratraqueal como los debidos a la tos o la respiración. La luz traqueal también puede verse distorsionada como consecuencia de compresiones extrínsecas, fisiológicas como las del arco aórtico y la arteria braquiocefálica, o patológicas en los casos de masas cervico-mediastínicas y anillos vasculares. La forma endoluminal de la tráquea puede variar también con diversas enfermedades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en al adulto y la traqueomalacia congénita en el niño.



## **Vascularización traqueal**

La vascularización arterial del tercio superior de la tráquea fue descrita en 1966 por Miura y Grillo<sup>3</sup> y se produce a través de tres ramas principales de la arteria tiroidea inferior siendo la primera o más inferior predominante. Salassa y colaboradores<sup>4</sup> completaron el estudio definitivo de la vascularización traqueal en 1977.

La vascularización traqueal se produce a través de pedículos laterales que irrigan porciones segmentarias a lo largo de la tráquea. La mitad superior traqueal es irrigada en la mayoría de los casos mediante tres ramas procedentes de la arteria tiroidea inferior. La primera rama vasculariza la tráquea cervical inferior con escasa contribución a la vascularización del esófago. La segunda rama irriga la sección media de la tráquea cervical y la tercera rama la sección más craneal. Estas dos ramas si contribuyen a la vascularización esofágica. No obstante la vascularización traqueal es variable y puede existir dos o una única arteria, o bien predominancia de una o más arterias. Las ramas arteriales traqueales pasan indistintamente anterior, posterior o en ambos lados del nervio laríngeo recurrente. En algunos casos la parte inferior de la tráquea cervical puede recibir vascularización de una rama procedente de la arteria subclavia.

Las arterias bronquiales suministran la vascularización de la carina traqueal y la porción inferior de la tráquea. Una rama anterior de la arteria bronquial superior se origina posteriormente del lado derecho de la aorta y discurre sobre la porción proximal del bronquio principal izquierdo hasta la carina anterior. Las ramas principal y posterior pasan detrás del esófago hasta el bronquio principal

derecho. Una de esas ramas puede proceder de una arteria intercostal suprema. La arteria bronquial media discurre alrededor de la porción medial del bronquio principal izquierdo y se anastomosa con la arteria bronquial superior o vasos traqueales superiores a nivel de la carina. La arteria bronquial inferior vasculariza principalmente el árbol bronquial izquierdo. El bronquio principal izquierdo es irrigado en ocasiones también por dos ramas aorticas procedentes del lado izquierdo

La vascularización de la porción media e inferior traqueal presenta mayor variabilidad, proviniendo generalmente de un sistema “braquiocefálico-subclavio” del que pueden contribuir a dicha vascularización arterias diversas como la arteria intercostal suprema, la arteria subclavia, la arteria torácica interna derecha y de la arteria braquiocefálica.

Se han identificado de tres a siete arterias traqueales principales a lo largo de toda la longitud de los pedículos laterales<sup>4</sup>. Los vasos primarios se dividen en ramas traqueales y esofágicas, justo a la altura del ángulo traqueoesofágico. Las ramas traqueales pasan directamente a la pared traqueal, ramificándose hacia arriba y hacia abajo sobre el ancho de varios anillos conectándose a su vez con las ramas de los siguientes vasos segmentarios superiores e inferiores. Estos vasos forman una irregular pero completa red de anastomosis longitudinales en la pared de la tráquea. De los vasos que llegan a la tráquea, las arterias intercartilaginosas transversales se extienden profundamente en la pared traqueal y se anastomosan con las del lado opuesto en la línea media. Estos vasos se ramifican en la submucosa. Las ramas intercartilaginosas más

pequeñas se dirigen hacia la parte posterior y terminan en la membranosa traqueal. La membranosa posterior de la tráquea también está vascularizada por pequeñas ramas secundarias de los vasos esofágicos primarios procedentes de las arterias traqueoesofágicas. Los cartílagos traqueales sólo reciben vascularización del plexo submucoso. El plexo submucoso tanto de la mucosa que recubre los cartílagos como el que recubre la pared membranosa se interconectan y son importantes en la vascularización de la membranosa traqueal.

### **1.3. CITOHISTOLOGÍA**

La composición citohistológica de la tráquea está condicionada a su origen embriológico. Como componente de la porción conductora del aparato respiratorio, consta en su porción más interna de una mucosa compuesta por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado<sup>5</sup>. La célula más abundante es la célula ciliada, con una distribución amplia a través de todo el espesor epitelial. Constan en la superficie de aproximadamente 250 estructuras ciliares que les permiten desarrollar una función de barrera mucociliar y de movilización de secreciones y partículas. Las células ciliadas se acompañan en menor medida de células mucosas o caliciformes, células en cepillo, células basales y células de gránulos pequeños. Las células mucosas o caliciformes se extienden a través de todo el espesor del epitelio dispersas entre las células ciliadas<sup>5</sup>. Se caracterizan por la ausencia de cilios apicales y un citoplasma más claro. Su función principal consiste en secretar moco a la superficie de la luz traqueal. Las células en cepillo son células cilíndricas con microvellosidades romas en su superficie apical que sirven como receptor sensitivo, a través de un contacto

sináptico con una terminación nerviosa aferente en su porción basal<sup>5</sup>. Las células de gránulo pequeño aparecen individualmente, dispersas en escasa cantidad entre el resto de tipos celulares del epitelio. Su función no es conocida con exactitud, pero algunas secretan diversas sustancias como catecolaminas, hormonas, serotonina, calcitonina, péptido liberador de gastrina, etc. Algunas se reúnen en grupos asociándose a fibras nerviosas para formar corpúsculos neuroepiteliales con una función presumiblemente reguladora de los reflejos que controlan el calibre de la vía aérea o vasos sanguíneos. Las células basales sirven como población celular de reemplazo del resto de células epiteliales de manera similar al resto de epitelios<sup>5</sup>. Soportando al epitelio traqueal y por debajo del mismo se localiza una membrana basal bien definida de entre 25 y 40 micras de espesor compuesta por fibras colágenas muy próximas entre sí. Suele ser considerada una parte de la lámina propia. La lámina propia se compone de un soporte de tejido conectivo laxo con abundantes fibras elásticas y una población celular abundante formada fundamentalmente por fibroblastos, plasmocitos, mastocitos, eosinófilos y linfocitos dispersos o distribuidos en zonas de tejido linfático difuso y nodular, formando el denominado “tejido linfoide asociado a bronquio” o “BALT”<sup>5</sup>. Más externamente a la lámina propia se encuentra la capa submucosa compuesta por tejido conectivo laxo en el que aparecen las porciones secretoras de algunas glándulas con acinos fundamentalmente mucosos, aunque algunos son mixtos, junto con vasos sanguíneos de distribución y linfáticos. Bajo la submucosa se encuentra cartílago hialino formando anillos incompletos, los cuales se distribuyen a lo largo de la tráquea. Entre los extremos de los cartílagos y formando la membranosa traqueal se

observa un tejido fibroelástico con una capa de musculo liso. La adventicia limita al cartílago en su parte externa.

#### **1.4. FISIOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LA VÍA AÉREA CENTRAL**

Las funciones básicas de la tráquea son conducir el aire desde la laringe hasta los bronquios, además de calentar y humidificar el aire inhalado y la eliminación de residuos y partículas. El transporte de aire depende directamente del diámetro interno de la tráquea. La resistencia al flujo a través de un cilindro viene representado por la ley de Hagen-Poiseuille, y es inversamente proporcional al radio de la circunferencia a la cuarta potencia, considerando un flujo laminar. Con flujos mayores, éste puede ser turbulento lo que incrementa la resistencia. Cualquier circunstancia que reduzca el calibre de la luz traqueal aumenta la resistencia al flujo aéreo. Un 50% en la reducción del diámetro interno supone un incremento en la resistencia de 1/16 y más de 1/32 con flujo turbulento<sup>6</sup>.

La vía aérea superior calienta y humidifica el aire inspirado en un proceso bastante eficiente. El aire inspirado a temperatura ambiente (24°C) presenta una humedad relativa de 50%. Durante su paso por la vía aérea superior y tráquea, el aire inspirado a temperatura ambiente es acondicionado calentándose completamente hasta 37°C y alcanzando una humidificación de casi el 100%. Cuando se consiguen estas condiciones, se alcanza el denominado punto de saturación isotérmico, que se alcanza a 5 cm de la carina bronquial, a nivel de la cuarta o quinta bifurcación alveolar. Cuanto más seco y frío sea el aire inspirado, más este punto se desplaza a la periferia del pulmón induciendo deshidratación

y enfriamiento del tejido pulmonar<sup>7</sup>. El aire ambiente a una temperatura de 22°C y 50% de humedad relativa aproximadamente contiene 10 mg/L de H<sub>2</sub>O, mientras que en el punto de saturación isotérmica se alcanzan 34 mg/L por lo que la humidificación optimiza el intercambio gaseoso.

Las glándulas traqueobronquiales producen una secreción rica en mucina que forma una barrera protectora entre el epitelio traqueal y el ambiente externo y facilita eliminación de microorganismos y partículas o residuos. La secreción está controlada por el sistema nervioso autónomo modulada por diversos mediadores inflamatorios<sup>8</sup>. Las secreciones respiratorias están formadas por dos o tres capas. Una capa interna cercana al epitelio, más fluida, permitiendo la movilización ciliar y superior a esta una capa de secreción mucosa, más gel, separada por una posible tercera capa de surfactante. El moco recoge sustancias de desecho y microorganismos, y es transportado cranealmente por fuerzas mecánicas combinando la movilización ciliar y el flujo aéreo espirado. La movilización de moco a expensas del flujo aéreo espirado depende de la velocidad de salida de aire durante la expiración, determinado por el diámetro de la vía aérea y la diferencia de presiones entre la presión intrapulmonar y la presión ambiental. La viscosidad del moco varía dependiendo las fuerzas de rozamiento y puede disminuir durante la tos, lo que se explica por un reajuste de las macromoléculas por la fuerza aplicada. La fluidez del moco depende directamente del estado de hidratación de la mucosa determinada por la relación agua/moco de la secreción<sup>9</sup>. El principal mecanismo de movilización mecánica de las secreciones mediante aumento del flujo aéreo espiratorio es la tos. Consiste en un aumento brusco y puntual del flujo aéreo espiratorio que se

desencadena a partir de la estimulación de zonas tusígenas como la mucosa traqueal a partir de la cual se desarrolla un reflejo sensitivo tusígenos. Las zonas tusígenas se encuentran principalmente en el aparato respiratorio sobre todo a nivel de la mucosa traqueal y bronquial, cuerdas vocales de la glotis, región interaritennoidea y pleura. Los estímulos a las zonas tusígenas pueden tener un origen diverso: inflamatorios (edema o hiperemia de la mucosa, irritación de la mucosa) mecánicos (inhalación de partículas, compresión de las vías aéreas) químico, térmico (aire caliente o muy frío) o psicógeno<sup>10</sup>.

La tos presenta un estímulo, una vía aferente que va al Centro Tusígeno situado cerca del centro respiratorio del bulbo raquídeo y una vía eferente que parte del Centro Tusígeno a los órganos encargados de hacer toser el individuo. Tras recibirse el estímulo tusígeno en los receptores tusígenos de la vía aérea es conducido en la vía aferente por el nervio Trigémico, Glossofaríngeo, Vago o nervio laríngeo superior, dependiendo de la zona tusígena estimulada. Una vez recibido el estímulo en el Centro Tusígeno en el bulbo raquídeo, se envía un mensaje en respuesta al estímulo por la vía eferente a través de los nervios laríngeo superior, frénico y los nervios raquídeos desarrollando el mecanismo de la tos<sup>10</sup>. La tos presenta tres fases consistentes en una fase inspiratoria donde el aire entra a los pulmones, una segunda fase de compresión donde hay contracción isométrica de los músculos espiratorios toracoabdominales por los nervios raquídeos y el cierre de la glotis lo que genera un aumento de la presión intratorácica, e inmediatamente después continua con una fase expulsiva donde se eleva el paladar para cerrar la comunicación con las fosas nasales y la súbita apertura de la glotis seguida por la descompresión abrupta del aire intratorácico

también por contracción brusca del diafragma por el nervio frénico que genera una rápida salida del aire inspirado que transporta la mucosa en dirección craneal<sup>10</sup>.

## **2. ESTENOSIS TRAQUEAL BENIGNA**

Se considera estenosis traqueal benigna aquella que no es de origen neoplásico. Son estenosis que tienen una causa frecuentemente iatrogénica, como en el caso de las estenosis postintubación o postraqueotomía con una fisiopatología basada en la inflamación local y posterior cicatrización con estenosis resultante. Sin embargo, se describen también otras causas menos frecuentes como las secundarias a enfermedades inflamatorias sistémicas, enfermedades del colágeno, patología infecciosa, las producidas por quemaduras químicas o rádicas y, por último, las denominadas estenosis idiopáticas.

### **2.1. CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA**

#### **2.1.1. Estenosis traqueal idiopática.**

Las estenosis idiopáticas se caracterizan por una lesión de origen inflamatorio y cicatricial de forma irregularmente circunferencial y de corta extensión (2-3 cm), aunque en algunas ocasiones la estenosis puede afectar a una porción mayor de la tráquea, carina, e incluso los bronquios principales. La localización descrita más frecuente es la tráquea superior y la subglotis<sup>11-13</sup>, pudiendo alcanzar las cuerdas vocales. Su incidencia se estima en 1:400.000



afectando casi exclusivamente al sexo femenino, con un posible papel etiológico por parte de las hormonas estrogénicas<sup>11-14</sup>, entre los 30 y los 50 años de edad aunque existen casos extremos de 13 y 74 años<sup>15,16</sup>. Su curso es habitualmente lento y las pacientes no tienen antecedentes de traumatismo, infección, daños por inhalación, intubación orotraqueal, ni otras enfermedades de la tráquea, del resto de la vía aérea, o de origen sistémico, aunque algunos autores sugieren una posible relación con el reflujo gastroesofágico<sup>17,18</sup>. Histológicamente, se observa inflamación crónica con fibrosis submucosa y abundante cantidad de fibroblastos y posterior formación de tejido cicatricial respetando los cartílagos traqueales.

### **2.1.2. Estenosis traqueal secundaria a inflamación local**

En este grupo se incluyen la estenosis traqueal postintubación y postraqueotomía cuya incidencia oscila entre el 10-22%<sup>19</sup>. Ambas son entidades bien conocidas con una incidencia global de 4,9 casos por millón de habitantes<sup>20</sup>.

#### **2.1.2.1 Estenosis traqueal postintubación**

La vascularización de la mucosa y submucosa traqueal es muy sensible a la isquemia por lo que el balón de la cánula de traqueotomía o del tubo orotraqueal puede producir una compresión de la mucosa traqueal que se traduce en isquemia y necrosis. La consecuencia es una erosión circunferencial de la mucosa traqueal que da lugar a una estenosis circunferencial y en ocasiones también a traqueomalacia. Si el daño erosivo continúa tras la estenosis traqueal podría llegar a producirse una fístula traqueo-esofágica si se perfora la pars membranosa (lo cual se ve favorecido si el paciente tiene sonda

nasogástrica) o una lesión de la arteria innominada si se perfora el cartílago anterior.

La presión de inflado del manguito es el principal factor desencadenante ya que con una presión superior a 20-25 mmHg se produce isquemia de la pared. Dicha isquemia puede comenzar en las primeras horas tras la intubación y desarrollar la estenosis en 3-6 semanas<sup>21,22</sup>. En algunos pacientes los síntomas de obstrucción aparecen precozmente a los 2 días de la extubación pero en la mayoría se producen más tarde, entre 10 y 40 días, con una longitud media de la estenosis de 2,6 cm<sup>23</sup>. La intubación prolongada también es uno de los factores etiológicos principales. Presiones menores pero mantenidas pueden conducir a dilatación y adelgazamiento de la pared traqueal con necrosis de los anillos traqueales. La isquemia y necrosis se ve favorecida en pacientes con presión de perfusión disminuida y también pueden contribuir al mecanismo de la estenosis la irritación por los materiales que componen el tubo, los gases de esterilización y las infecciones bacterianas. Otros factores que se han relacionado con el desarrollo de estenosis traqueal postintubación son la intubación traumática, historia de intubación previa, edad avanzada, sexo femenino, obesidad, fallo respiratorio severo, enfermedad por reflujo gastroesofágico severa, enfermedades autoinmunes asociadas, síndrome de apnea-hipopnea del sueño y radioterapia local<sup>24</sup>.

Aunque la mayoría de las localizaciones se encuentran en la tráquea, pueden aparecer también estenosis a nivel subglótico. Los tubos orotraqueales pueden provocar una lesión laríngea en la región subglótica tras únicamente 48 horas de

intubación. El anillo cricoideo es la porción más estrecha de la vía aérea por lo que las intubaciones traumáticas, permanentes o con tubo de grueso calibre, pueden producir ulceración de la mucosa y del cartílago desencadenando una condritis con supuración y formación de granulomas. A nivel de las apófisis vocales de los aritenoides y la comisura posterior laríngea también se pueden producir lesiones por decúbito con ulceraciones y posterior cicatrización, fijando los aritenoides en la línea media con la consiguiente limitación de la movilidad de las cuerdas vocales<sup>25</sup>.

Existen diferentes tipos de lesiones:

- 1 Estenosis simple: afecta a mucosa y submucosa sin lesión del soporte cartilaginoso traqueal
- 2 Estenosis compleja: con afectación añadida del cartílago traqueal

#### **2.1.2.2. Estenosis traqueal postraqueostomía**

La realización de una traqueotomía supone un defecto en la pared anterior de la tráquea cervical. Tras la retirada de la cánula de traqueotomía se produce un cierre del defecto por segunda intención que puede conllevar una excesiva formación de tejido de granulación alrededor del estoma y sobre el cartílago previamente dañado<sup>19</sup>. Además, la herida de la traqueotomía puede estar en ocasiones colonizada por bacterias del tracto respiratorio que producen necrosis local y agravan la lesión. El proceso de cicatrización puede desarrollar una estenosis anterior cuya severidad de contracción dependerá de la extensión del defecto y el grado de necrosis e infección<sup>26</sup>. El resultado es una estenosis compuesta de una cicatriz contraída del traqueostoma anterior y formación de

granulomas de intensidad variable con una longitud media de 1,2 cm<sup>27</sup>. La tasa de estenosis traqueal tras traqueotomía se ha cifrado en rangos variables entre el 1% a 20%<sup>26-28</sup>. También se pueden producir lesiones a nivel subglótico por cricotiroidotomías y por erosión del cricoides provocada por traqueotomías excesivamente altas en pacientes con severa cifosis cervical o el empleo de cricotiroidostomías.

### **2.1.3. Estenosis traqueal secundaria a enfermedades sistémicas inflamatorias crónicas**

#### **2.1.3.1. Estenosis traqueobronquial en la amiloidosis**

En la enfermedad por depósito amiloide, la obstrucción subglótica es la forma más común (23% de todas las lesiones sintomáticas benignas) con lesiones que varían desde una afectación difusa hasta lesiones focales en forma de masas que simulan tumores<sup>29</sup> dando lugar a estenosis irregulares, engrosamientos de la pared y calcificaciones<sup>30</sup>.

#### **2.1.3.2 Estenosis traqueobronquial en sarcoidosis**

La afectación granulomatosa sarcoidea varía desde estenosis inflamatorias únicas o múltiples hasta estrechamientos difusos de la vía aérea<sup>31-33</sup> como consecuencia de la formación de granulomas en la vía aérea que da a la mucosa con un aspecto en empedrado<sup>31</sup>. La afectación de la vía aérea puede ocurrir sin afectación parenquimatosa<sup>31,34</sup>. La estenosis secundaria a compresión extrínseca por adenopatías mediastínicas es infrecuente<sup>35</sup>.

### **2.1.3.3. Estenosis traqueobronquial en la policondritis recidivante**

La policondritis recidivante es una enfermedad autoinmune con episodios recurrentes de inflamación que afectan a estructuras cartilaginosas como las orejas, nariz, articulaciones periféricas, laringe y árbol traqueobronquial<sup>36,37</sup>. Es más frecuente entre la cuarta y la quinta década de la vida. Hasta el 50% de los pacientes pueden presentar en la vía aérea lesiones en forma de estenosis focales subglóticas o traqueobronquiales, con o sin calcificaciones, y/o malacia focal o difusa con colapso espiratorio<sup>38</sup>.

### **2.1.4. Estenosis traqueal secundaria a enfermedades del colágeno-vasculitis: Enfermedad de Wegener**

La enfermedad granulomatosa de Wegener puede cursar con afectación de la vía aérea que puede estar presente en un 15-55% de los casos<sup>39,40</sup> siendo en un 25% de los casos la única manifestación de la enfermedad. Suele afectar a pacientes jóvenes, por debajo de los 30 años, con predominio del sexo femenino.<sup>41,42</sup> Las manifestaciones respiratorias incluyen obstrucción y/o necrosis del cartílago nasal, estenosis traqueal y bronquial, malacia, formación de membranas, nódulos y masas, infiltrados alveolares y cavitaciones,<sup>43-45</sup> siendo la estenosis subglótica la manifestación más frecuente en la vía aérea<sup>46,47</sup>. La afectación de la pared posterior de la tráquea es frecuente a diferencia de otras patologías como la policondritis recidivante o la traqueobroncopatía osteocondroplásica<sup>48,49</sup>.

### **2.1.5. Estenosis traqueobronquial de origen infeccioso: Tuberculosis**

Entre el 10 y el 40% de las tuberculosis pulmonares activas tienen componente endobronquial<sup>50,51</sup> afectando los bronquios principales hasta el 60-95% de los casos<sup>52</sup> con mayor riesgo en caso de retraso diagnóstico o terapéutico<sup>53,54</sup>. La causa más probable es la afectación de nódulos linfáticos con posterior fistulización hacia los bronquios adyacentes<sup>55</sup>. La tuberculosis endobronquial puede presentarse como una lesión caseosa-edematosa, hiperémica, fibroestenótica, granular, tumoral o ulcerativa<sup>53</sup>.

### **2.1.6. Miscelánea: otras estenosis traqueales**

#### **2.1.6.1. Traqueobroncopatía osteocondroplástica**

La traqueobroncopatía osteocondroplástica es una rara enfermedad, no tumoral, que afecta a la tráquea y en menor porcentaje los bronquios principales, en la que nódulos submucosos de origen cartilaginoso u óseo se proyectan sobre la luz de la vía aérea<sup>56-59</sup>. Estos nódulos pueden ser de diferentes tamaños, normalmente entre 1-3 mm, y se localizan en la pared anterolateral de la tráquea respetando la pared posterior<sup>60</sup>. Estos pueden causar deformidad y estrechamiento de la tráquea, superando más del 50% de la luz en menos del 10% de los casos<sup>56</sup>. Se postula que pueda ser el resultado de metaplasia del tejido conectivo mesenquimal adyacente a la submucosa, teniendo en cuenta la presencia de determinadas citocinas (BMP-2, TGF- $\beta$ 1) en mayor cantidad de la habitual<sup>61</sup>. Esta enfermedad no tiene asociación con el tabaquismo y su prevalencia es similar en ambos sexos siendo la mayor parte de los casos personas de mediana edad en el momento del diagnóstico<sup>62,63</sup>. La Tomografía

axial computerizada (TAC) demostrará nódulos submucosos densamente calcificados protruyendo en la luz de la vía aérea en su pared anterolateral<sup>58,60,62</sup>. Estos mismos hallazgos se confirmarán mediante la exploración broncoscópica. Si el aspecto es típico, la biopsia no es necesaria. En caso de realizarla se encuentra hueso o calcificación de la submucosa bronquial<sup>56</sup>. La traqueobroncopatía osteocondroplástica es una enfermedad de curso benigno y lento en la que raras veces se producen complicaciones como neumonías postobstructivas o fallo respiratorio<sup>62</sup>. En el caso de presentar síntomas obstructivos, la mayoría de los pacientes se tratan mediante el desbridamiento endoscópico junto con el uso de láser y endoprótesis<sup>56,59,62</sup> e infrecuentemente se requiere de la resección quirúrgica.

#### **2.1.6.2. Compresiones traqueales extrínsecas**

Se han descrito estenosis traqueales secundarias a compresiones extrínsecas de múltiples tipos: bocios de gran tamaño<sup>64</sup> que comprimen la tráquea cervical, hematomas o masas mediastínicas<sup>65</sup>, anillos vasculares<sup>66</sup>, adenopatías, y compresión traqueal por arteria innominada anómala<sup>67, 68</sup>.

#### **2.1.6.3. Lesiones por agentes químicos**

Las estenosis traqueales por ingesta de cáusticos<sup>69</sup> son las más frecuentes secundarias a agentes químicos, y suelen conllevar graves lesiones esofágicas con fistulizaciones en ocasiones. También han sido descritas en relación a la inhalación de agentes químicos o en grandes quemados<sup>70</sup>, aunque debido a la frecuente necesidad de intubación y ventilación mecánica se hace difícil en ocasiones discernir el agente causal de la estenosis.

## 2.2. ESTENOSIS TRAQUEAL EN LA EDAD PEDIÁTRICA

### 2.2.1. Estenosis traqueal adquirida y estenosis subglótica

La estenosis traqueal, incluyendo la de localización subglótica, en la edad pediátrica es en la mayoría de los casos de origen adquirido y generalmente secundaria a un periodo de intubación endotraqueal (1-10% de los pacientes intubados)<sup>71</sup>. En neonatos y lactantes suele manifestarse como fracaso de la extubación, mientras que en pacientes más mayores suele aparecer disfonía mantenida tras la extubación que evoluciona a dificultad respiratoria y estridor<sup>72</sup>. En los pacientes pediátricos, las estenosis subglóticas se gradúan de acuerdo a la clasificación de Myer-Cotton pudiendo ser: grado I si la obstrucción de la luz es menor del 50%; grado II entre 51-70%; grado III entre el 71-99% y grado IV cuando no hay lumen detectable<sup>73</sup>.

Las lesiones con importante componente de edema pero sin necrosis pueden responder a un tratamiento conservador consistente en ventilación no invasiva, corticoide y antibioterapia sistémica, pudiendo conseguir la extubación definitiva a los 2-4 días<sup>74</sup>. En lesiones agudas y subagudas de menos de 1 cm de longitud, sin afectación del soporte cartilaginoso, se optará por un tratamiento endoscópico intervencionista incluyendo algunas de las técnicas siguientes: fotoresección con láser, dilatación neumática, aplicación de mitomicina C, inyección local de corticoides, e incluso colocación de endoprótesis en la vía aérea<sup>75-79</sup>. Las opciones quirúrgicas en el tratamiento de las estenosis traqueales y/o subglóticas en la infancia se dividen en dos tipos: técnicas de expansión del marco cartilaginoso, y técnicas de resección de la estenosis. Dentro del primer



grupo se incluye el “*split*” *cricotiroideo anterior*<sup>80</sup> que consiste en una incisión en la línea media cervical que engloba cartílago tiroides, desde 2-3mm por debajo de la quilla tiroidea, membrana cricotiroidea, anillo cricoideo y 2 primeros anillos traqueales. Está indicada en neonatos con estenosis subglótica grados I-II con fracaso de extubación previa. Otra opción para pacientes más mayores con estenosis más graves (grados II y III de Myer-Cotton) es la “*laringotraqueoplastia con injerto anterior y/o posterior de cartílago costal autólogo*”<sup>81,82</sup>. Se puede realizar en un solo tiempo (sin traqueotomía protectora), si bien en los casos más complejos se suele optar por su realización en 2 tiempos (con traqueotomía protectora y tutor endolaríngeo). En pacientes con estenosis graves, grados III y IV, o en aquellos casos en los que las técnicas de expansión han fracasado está indicada la resección cricotraqueal parcial (técnica de Pearson). En caso de resecciones amplias, se puede plantear cirugía en dos tiempos dejando un tutor endoluminal durante 4-6 semanas<sup>82,83</sup>.

### 2.2.2. Estenosis traqueal congénita

La estenosis traqueal congénita (ETC) es una lesión obstructiva de la vía aérea en niños muy poco frecuente. Consiste en un desarrollo anormal del esqueleto cartilaginoso traqueal que se traduce habitualmente en la ausencia de pars membranosa, por lo que los anillos traqueales son del tipo circulares completos. La ETC puede tener una localización, extensión y severidad variables<sup>84</sup> representando entre el 0.3 y 1% de todas las estenosis laringotraqueales<sup>85</sup>. Aunque en la mayoría de los casos los pacientes con ETC presentan síntomas severos, hay cierta variación en la presentación clínica con casos de estenosis leves o moderadas siendo relativamente bien toleradas. Los

síntomas pueden comenzar inmediatamente después del parto con un cuadro de dificultad respiratoria grave o a los pocos meses por el incremento en la demanda respiratoria. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son el estridor bifásico, la retracción supraesternal y subcostal, la cianosis o la neumonía recurrente<sup>86</sup>. La ETC ha sido clasificada de acuerdo a aspectos clínicos y morfológicos relacionados con la longitud y severidad de la estenosis<sup>87-89</sup>. Speggorin et al<sup>90</sup> propusieron una nueva clasificación morfológica ordenando las muy diversas presentaciones anatómicas de la ETC. Las anomalías asociadas son frecuentes y concretamente las malformaciones de tipo cardiovascular son muy relevantes e influyen significativamente en el pronóstico del paciente<sup>91</sup>. La asociación ETC con “sling” de la arteria pulmonar izquierda ocurre en un 40-50% de los casos<sup>92</sup>. El diagnóstico se realiza mediante broncoscopia y TAC helicoidal con reconstrucción multiplanar. La exploración broncoscópica ha de ser muy cuidadosa ya que existe el riesgo de obstrucción completa de la vía aérea al progresar el fibrobroncoscopio distalmente a la estenosis. También será de utilidad la realización de ecocardiograma para el diagnóstico de cardiopatías congénitas asociadas que sean susceptibles de corrección quirúrgica en el mismo tiempo, así como estudio de reflujo gastroesofágico<sup>87</sup>.

Actualmente, la técnica de “traqueoplastia por deslizamiento” es el tratamiento de elección en pacientes sintomáticos con ETC<sup>93</sup>. La reparación de las malformaciones cardiovasculares asociadas debe hacer en el mismo acto quirúrgico<sup>94</sup>. Esta técnica se realiza mediante esternotomía media y con soporte de circulación extracorpórea<sup>95,96</sup>. Básicamente, consiste en la sección

transversal de la tráquea estenótica en su punto medio, procediendo a la apertura longitudinal posterior del colgajo proximal y anterior del distal hasta alcanzar tráquea de calibre normal. Posteriormente se realiza una anastomosis latero-lateral de los dos colgajos traqueales. Esta técnica ha dado muy buenos resultados y se puede emplear tanto en segmentos estenóticos cortos (menos de un tercio de la longitud traqueal total) como largos<sup>93</sup>, aunque en estenosis segmentarias la técnica de resección del segmento estenótico con anastomosis termino-terminal también está indicada.

### **3. ESTENOSIS TRAQUEAL BENIGNA: DIAGNÓSTICO**

#### **3.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.**

En la estenosis traqueal de origen benigno las manifestaciones clínicas generalmente dependen del grado de obstrucción así como de la localización y el tiempo de evolución de la misma. Los síntomas habituales incluyen disnea, tos, hemoptisis y sibilancias. La aparición de estridor inspiratorio agudo y dificultad respiratoria son signos de obstrucción grave. Mientras que la disnea de esfuerzo típicamente indica una luz traqueal > 8 mm, el estridor se desarrolla cuando la luz traqueal es <5 mm y, por lo tanto, debe considerarse una presentación potencialmente mortal.

En el paciente pediátrico, conviene diferenciar entre estenosis congénita y adquirida. En el caso de la estenosis congénita, la forma de presentación

dependerá del tipo anatómico, grado de estenosis y presencia o no de procesos infecciosos sobreañadidos, oscilando entre el recién nacido con distres respiratorio inmediato al que no se consigue intubar (de alta mortalidad) a casos más sutiles con estenosis de luz traqueal que pasan inadvertidas con síntomas leves hasta que una infección respiratoria sobreañadida precipita una obstrucción respiratoria que puede ser letal<sup>97,98</sup>. El síntoma más frecuente es el estridor mixto o las sibilancias, seguido del distres respiratorio atípico, formas atípicas de Croup o bronquiolitis<sup>97,98</sup>. Pueden cursar con anomalías asociadas del tipo respiratorio (hipoplasia pulmonar, enfisema lobar, hernia diafragmática, diafragma accesorio, laringomalacia o estenosis bronquial), cardiovasculares (anillos vasculares) o esqueléticas<sup>72,99</sup>. En el caso de la estenosis traqueal adquirida se caracteriza por la existencia de causas conocidas (intubaciones, quemaduras, cuerpos extraños, infección, anillos vasculares, etc.)<sup>99,100</sup>. Las manifestaciones clínicas son similares a las de la forma congénita con una intensidad variable. Puede asociarse a estenosis en otros segmentos de la vía aérea central o haber afectación de las cuerdas vocales o procesos inflamatorios cicatriciales supraglóticos. Suelen ser pacientes con antecedentes de intubación, imposibilidad de extubación o estridor postextubación y pacientes traqueostomizados con diagnóstico conocido de estenosis traqueal adquirida<sup>100</sup>.

### **3.2. EXPLORACIONES DIAGNÓSTICAS**

#### **3.2.1. Broncoscopia.**

La prueba “Gold standard” para la exploración de una la estenosis traqueal o laringotraqueal es la broncoscopia flexible o fibrobroncoscopia<sup>22,101</sup>. Se suele

realizar bajo sedación ligera y anestesia local laringotraqueal. En pacientes portadores de traqueostomía, es necesario retirar la cánula para realizar una adecuada y exhaustiva exploración. Cuando por razones clínicas esta prueba no es tolerada por el paciente es conveniente realizar la exploración con una sedación más profunda, o bien, mediante broncoscopio rígido<sup>102,103</sup>. Deben explorarse:

- Funcionalidad y estabilidad de la laringe (movilidad de las cuerdas vocales, de los aritenoides, existencia de sinequias...).
- Localización exacta de la lesión, inspección semicuantitativa del grado de estenosis (establecer el porcentaje aproximado de obstrucción o de luz remanente), longitud, extensión y forma de la lesión, carácter concéntrico o excéntrico, forma membranosa o de cilindro, existencia de zonas malácicas, relación con traqueostomías previas o actuales, aspecto de la mucosa.
- Distancia del borde proximal a cuerdas vocales y al borde inferior del cricoides, distancia de borde caudal a carina traqueal, distancia del borde proximal

La broncoscopia aporta además la posibilidad de realizar cultivo de secreción endobronquial para diagnosticar la posible colonización bacteriana así como biopsia para su estudio anatomopatológico.

### **3.2.2. Pruebas de imagen.**

La TAC es una herramienta fundamental para el estudio de la estenosis traqueal y laringotraqueal, ya que aporta información de la longitud y calibre de la estenosis, así como del grado de desestructuración de la pared de la vía aérea, y del compromiso de los órganos vecinos a la lesión. Es necesaria la realización de TAC torácico con paciente en decúbito supino y brazos por encima de la

cabeza, incluyendo desde la nasofaringe hasta 2 cm por debajo de carina traqueal, con cortes tomográficos de 1-2 mm, tanto en ventana mediastínica como en ventana pulmonar<sup>104</sup>. No es estrictamente necesaria la utilización de contraste intravenoso, salvo que se observe patología asociada de los vasos cervicales. Cuando el paciente sea portador de cánula de traqueostomía o prótesis, es necesario retirarla siempre que sea posible para conseguir una correcta exploración radiológica. Es necesario obtener mediciones de:

- Longitud de la estenosis (cráneo-caudal).
- Calibre o luz de la estenosis (máximo y mínimo).
- Distancia desde el borde craneal hasta el borde inferior del cricoides y hasta el borde inferior de las cuerdas vocales y distancia desde el borde inferior de la lesión a carina.

En los últimos años se ha desarrollado la broncoscopia virtual, que permite la reconstrucción por imagen en dos y tres dimensiones de la luz traqueobronquial<sup>105-107</sup> con el inconveniente que no aporta información sobre el aspecto de la mucosa y que algunas lesiones pequeñas (en torno a 2 mm de tamaño) pueden pasar desapercibidas.

La resonancia magnética nuclear (RMN) puede ser útil en el estudio de las estenosis traqueales. El examen se realiza con una secuencia T1 complementada por una secuencia T2. La secuencia ponderada en T1 demuestra la anatomía de la tráquea y las estructuras circundantes con gran detalle. La secuencia ponderada en T2 permite una mayor caracterización de la lesión. La RMN puede aportar información sobre las propias capas de la vía aérea detectando posibles alteraciones cicatriciales incipientes en la mucosa<sup>108</sup>

o en el estudio del cartílago traqueal<sup>109</sup>. Contribuye al estudio detallado de estructuras vecinas aportando información precisa sobre patología o malformaciones asociadas de origen esofágico o cardiovascular como malformaciones intracardiacas o sling de arteria pulmonar<sup>109</sup>. Además, en paciente pediátrico evita el uso de radiaciones ionizantes.

La radiografía de tórax anteroposterior y lateral es el estudio convencional para la evaluación inicial de la tráquea y las vías aéreas centrales. En las radiografías de tórax, son visibles la tráquea cervical distal, la tráquea intratorácica y los bronquios principales; sin embargo, las estructuras mediastínicas suprayacentes a menudo oscurecen las anomalías traqueobronquiales intratorácicas. Las radiografías de tórax oblicuas bilaterales pueden mejorar la evaluación traqueal al girar la columna vertebral y las estructuras mediastínicas lejos de la tráquea. La visualización de las anomalías traqueales también se puede mejorar mediante la técnica de alto voltaje (140 kV)<sup>110</sup>.

#### **4. ESTENOSIS TRAQUEAL: TRATAMIENTO**

Las estenosis traqueales sintomáticas se pueden tratar de diversas maneras. Con el reciente desarrollo de la broncoscopia intervencionista, o terapéutica, lesiones que antes hubieran requerido inevitablemente un tratamiento quirúrgico se pueden abordar actualmente de forma segura y eficaz con procedimientos broncoscópicos poco invasivos. No obstante, la cirugía sigue

teniendo un papel fundamental en el tratamiento de la estenosis traqueal y/o bronquial. A continuación, describimos las técnicas y procedimientos más habituales empleados en el manejo terapéutico de la estenosis traqueal benigna.

## **4.1. TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO**

### **4.1.1. Antecedentes históricos de la broncoscopia**

Se considera al médico alemán Gustav Killian<sup>111</sup> el padre de la broncoscopia rígida. Desarrolló el primer esofagoscopio y broncoscopio rígidos iluminados con una fuente de luz externa y un espejo frontal, y describió en su “on direct bronchoscopy” la técnica de realización de una broncoscopia a finales del siglo XIX. Es precisamente esta fecha, mayo de 1898, donde se acuña por primera vez el término broncoscopia en la bibliografía<sup>112</sup>. Paralelamente en Filadelfia (EEUU), Chevalier-Jackson<sup>113</sup> establece la broncoscopia como una nueva técnica médica. En su libro “*Endoscopy*” se describe el instrumental, la técnica y las indicaciones de la broncoscopia<sup>114</sup>. En años posteriores se funda la *American Bronchoesophagological Association* impartiendo cursos y estableciendo la broncoscopia como una técnica ampliamente aceptada para la exploración endoscópica traqueobronquial. Ya en el siglo XX proliferan broncoscopistas en otros países: Guisez y Philip en Francia, Brunnings en Alemania, y en España los doctores Cisneros, Tapia, Botella y Barajas<sup>115</sup>. Entre 1950 y 1960, Castella Escabros y Coll Colomé en Barcelona, y Blanco Rodríguez y Guerra Sanz en Madrid, celebran los Cursos teórico-prácticos de Broncología y Broncoscopia.



El desarrollo de la broncoscopia no hubiera sido posible sin un desarrollo tecnológico asociado. Chevalier-Jackson diseñó el primer broncoscopio autónomo con una pequeña bombilla en su extremo distal. Así, desarrolló un broncoscopio rígido de iluminación distal con lentes ópticas y canal de aspiración incorporado. Broyles, discípulo de Jackson, desarrolló las ópticas telescópicas con iluminación distal y Fourestier inventó el broncoscopio de “luz fría”, que proporcionó una visión clara y nítida del árbol bronquial<sup>116</sup>. Posteriormente, en la mitad del siglo XX, Shigeto Ikeda desarrolló los primeros prototipos de fibrobroncoscopios en Japón<sup>117</sup>. En 1980, Dumon y Toty desarrollaron las primeras experiencias con la aplicación de láser, con lo que se inició la era de la broncoscopia intervencionista<sup>118</sup>.

#### **4.1.2. Técnicas broncoscópicas terapéuticas**

##### **4.1.2.1. Dilatación neumática**

La dilatación con balón neumático es un tratamiento habitual para la estenosis de la vía aérea central que se puede usar en monoterapia o en combinación con otras técnicas broncoscópicas<sup>119-122</sup>. Se basa en conseguir una dilatación de la luz estenótica de la vía aérea mediante el inflado de catéteres con balón de calibre progresivamente crecientes. Es una técnica que ha sustituido paulatinamente la dilatación clásica con broncoscopios rígidos de tamaños progresivamente mayores.

Existen diversos tipos de catéteres para dilatación, siendo en muchos casos de características similares a los utilizados en cardiología intervencionista.

La elección de un catéter con balón del tamaño adecuado se basa en la longitud y diámetro estimados de la estenosis en función de pruebas de imagen y medidas observadas en exploraciones broncoscópicas previas. La longitud del globo suele ser al menos 0,5 cm mayor que la del segmento estenótico con unas longitudes habituales entre 2,5 y 4 cm. La longitud del globo debe ser lo suficiente como para que sobresalga más allá de cada extremo de la estenosis asegurando la dilatación completa de la lesión pero no excesivamente largo para evitar que pueda lesionar la vía respiratoria sana. Si el globo no es lo suficientemente largo tiende a deslizarse fuera de la estenosis al rellenarse.

El diámetro del balón inflado debe ser mayor que el de la lesión para que se produzca una dilatación efectiva pero no en exceso ya que podría ocasionar una rotura de la vía aérea. Por este motivo, se suelen utilizar catéteres con diámetros progresivamente crecientes hasta conseguir el objetivo de calibre de vía aérea propuesto.

La presión generada es variable en función de las características del globo en particular teniendo en cuenta que el diámetro del globo es proporcional a la presión de inflado. Las presiones de inflado habituales están entre 45 y 131 psi (3 a 9 atm). El inflado debe hacerse gradualmente evitando presiones excesivas que pudieran propiciar roturas o desgarros. El tiempo de inflado inicial suele ser corto (30 segundos a dos minutos) dependiendo de la tolerancia del paciente (peor tolerancia en lesiones traqueales que en bronquiales donde la dilatación supone una oclusión completa de la vía aérea) y los efectos sobre la oxigenación. A continuación, se desinfla comprobando bajo visión directa endoscópica el

calibre obtenido y la posibilidad de complicaciones. En determinados casos, como en las estenosis circunferenciales muy severas, puede ser útil hacer la realización previa a la dilatación de incisiones radiales mediante láser.

Las lesiones que más se benefician de la dilatación con balón son las estenosis benignas sintomáticas en contraposición a las estenosis secundarias a traqueobroncomalacia, calcificación o neoplasia. La estenosis con forma concéntrica y de tipo inflamatorio también es más propicias para la dilatación que las lesiones con forma de “cuello de botella” ya que estas últimas son estenosis complejas y se asocian generalmente con la pérdida de cartílago de soporte<sup>123</sup>. Las lesiones con mayor riesgo y por tanto menos adecuadas son aquellas que asocian ulceración o fragilidad de la mucosa debido al riesgo de ruptura, al igual que las lesiones muy vascularizadas por elevado riesgo de sangrado. En cuanto a la longitud, no hay un límite real con respecto a la longitud de la estenosis que se puede dilatar ya que incluso las estenosis más largas se pueden dilatar gradualmente y en secciones. La dilatación con balón está contraindicada cuando no se visualiza la vía aérea más allá de la lesión o cuando la estenosis es demasiada estrecha para poder pasar el catéter de dilatación. La intubación y la ventilación mecánica no son una contraindicación para el procedimiento

Varias series de casos publicadas reportan tasas variables de éxito con la dilatación con balón<sup>124-133</sup>. Sin embargo, la gran variabilidad entre los autores en cuanto a la definición de éxito y la técnica realizada, el origen diverso de la estenosis, y la ocasional falta información de seguimiento a largo plazo hacen

difícil obtener conclusiones consistentes. No obstante, en la mayoría de las publicaciones las tasas de éxito inmediato (mayor calibre de visu tras el tratamiento) y el éxito a corto plazo son altas (>90%) con una mejor permeabilidad de la vía aérea (radiológica y broncoscópica), síntomas y función pulmonar. Sin embargo, el principal problema de la dilatación neumática es la duración limitada del éxito terapéutico inicial con tasas de re-estenosis elevadas<sup>134</sup> (80% a 32 meses) sobre todo si se emplean en monoterapia sin asociar una posterior colocación de endoprótesis tras conseguir un calibre adecuado. Por otra parte, tal y como se ha comentado, la dilatación neumática es frecuentemente usada en estenosis de bronquios principales y divisiones también en divisiones bronquiales más distales.

La dilatación broncoscópica con balón neumático es generalmente bien tolerada y las complicaciones debidas a este procedimiento son en general poco frecuentes. Se han comunicado dolor torácico, broncoespasmo o atelectasias<sup>134</sup>. El inflado excesivo del balón puede dar lugar a laceraciones o roturas de la vía aérea central que pueden conllevar hemorragia, neumotórax, neumomediastino o mediastinitis. No se han descrito fallecimientos como consecuencia de la dilatación con balón<sup>135,136</sup>. Aunque las laceraciones son un riesgo durante la dilatación, especialmente cuando la estenosis es firme y circunferencial, a menudo se resuelven espontáneamente después de un tratamiento conservador<sup>135,136</sup>. Las incisiones radiales con láser antes de la dilatación neumática pueden disminuir esta posible complicación.

#### **4.1.2.2. Endoprótesis**

Las prótesis endotraqueales tienen como misión mantener la estructura y permeabilidad de la vía aérea permitiendo la adecuada ventilación y oxigenación. La colocación de prótesis tiene su papel en estenosis de la vía aérea de origen benigno o maligno fundamentalmente en los casos donde la cirugía está contraindicada. Hay básicamente dos tipos de prótesis: las de tipo plástico, generalmente de silicona, y las metálicas. En los últimos años se han incorporados prótesis de tipo híbrido (plástica y metálica) y las de material biodegradable.

##### **A) Prótesis metálicas**

Las prótesis metálicas utilizadas en la vía aérea derivan de prótesis endovasculares previas y se componen de una malla metálica más o menos densa en forma cilíndrica. Su colocación es relativamente sencilla desde el punto de vista técnico ya que la mayoría de ellas son autoexpandibles. Pueden ser muy eficaces en la restauración de una vía aérea permeable pero, por otra parte, este tipo de prótesis no está exenta de complicaciones sobre todo a largo plazo<sup>137,138</sup>. Entre sus ventajas destaca que tienen una relación pared/diámetro interno que es muy favorable y una excelente adaptabilidad a la forma de la vía aérea, así como un adecuado aclaramiento mucociliar. Sin embargo, su forma de malla permite la permeabilidad a su través de tejido neoplásico o la formación de granulomas. Su integración en la mucosa de la vía aérea hace que presenten bajo riesgo de migración pero, por el contrario, su eventual retirada puede ser extremadamente dificultosa con posibilidad de iatrogenia severa<sup>139</sup>. Para intentar paliar estos inconvenientes, las prótesis metálicas (“stents”, en su denominación

inglesa) pueden incorporar una cobertura de un material sintético o plástico que hace de barrera, denominándose prótesis “mixtas” o “híbridas”. Este tipo de endoprótesis evita el crecimiento tumoral a través de la malla metálica en casos de estenosis malignas, disminuye la formación de tejido de granulación y su retirada es más fácil. Por otra parte, al estar recubiertas por un material plástico presentan mayor capacidad de migración<sup>140</sup>.

Existe una gran variedad de prótesis metálicas disponibles por lo que se hará referencia a las más relevantes. La prótesis de Gianturco fue la primera prótesis que se pudo colocar mediante fibrobroncoscopia, y posteriormente se incorporaron una segunda generación de prótesis metálicas entre las que destacan las de: Wallstent, Ultraflex, Poliflex y Dynamic (algunas de ellas del tipo híbrido). En la edad pediátrica, la prótesis metálica más frecuentemente implantada es la de Palmaz (Johnson & Johnson; New Brunswick, NJ) que está hecha de acero inoxidable y es expandible con balón neumático<sup>141</sup>.

#### Prótesis de Gianturco (Cook Medical; Bloomington, IN)

La prótesis de Gianturco es una prótesis autoexpandible formada por hilos de metal entrelazados formando zig-zag y en forma de cilindro. Es el paradigma de prótesis metálica, con fácil colocación y buena estabilidad, pero se han descrito complicaciones graves con su uso como rotura de la prótesis, perforación de la vía aérea, erosión grave de la arteria pulmonar y formación de tejido de granulación por lo que actualmente está en desuso<sup>142</sup>.

Prótesis de Wallstent (Boston Scientific; Natick, MA)

La prótesis de Wallstent es una malla autoexpandible a base de filamentos de una aleación de cobalto con opción de cobertura de poliuretano o silicona. Presenta gran adaptabilidad a vías aéreas irregulares. La malla es más tupida en un intento de disminuir su permeabilidad y su expansión más limitada con menor riesgo de perforación de la pared traqueal. La complicación más frecuente con este tipo de prótesis es la formación de tejido de granulación por erosión de los bordes de la endoprótesis. No se ha descrito la migración ni la formación de tapones de moco<sup>143</sup>.

Prótesis de Ultraflex (Boston Scientific; Natick, MA)

La prótesis de Ultraflex es una malla de nitinol (aleación de níquel y titanio) con propiedades denominada “de memoria”: el dispositivo se deforma a bajas temperaturas pero adopta su forma original cuando la temperatura aumenta por lo que presenta una alta adaptabilidad y versatilidad. Existen dos tipos: una no cubierta y otra cubierta de poliuretano (híbrida). Presenta frecuente formación de granulomas a nivel de los anclajes metálicos proximal y distal<sup>144</sup>.

Prótesis de Polyflex (Boston Scientific; Natick, MA)

Es una prótesis híbrida que consiste en una malla de alambre de poliéster cubierta de silicona por lo que tiene mayor riesgo de migración pero reduce la permeabilidad de la pared del dispositivo. Tiene gran elasticidad y es capaz de adaptarse a las irregularidades de vía aérea. Presenta una pared fina por lo que tiene una buena relación diámetro interno/ diámetro externo<sup>143</sup>.

Prótesis Dynamic (Boston Scientific; Natick, MA)

Es una endoprótesis de tipo híbrido compuesta de silicona reforzada por aros metálicos que imitan la estructura cartilaginosa de la tráquea. Tiene forma de “Y” para poder tutorizar también los bronquios principales. Precisa un dispositivo de implantación específico con broncoscopia rígida<sup>143</sup>.

**B) Prótesis plásticas.**

Están elaboradas con silicona y son las más frecuentemente utilizadas en la neumología intervencionista del paciente adulto. Sus ventajas e inconvenientes están reflejados en la Tabla 1. Existen diversos tipos disponibles:

Prótesis de Montgomery (Boston Medical Products; Westborough, MA)

Fue la primera prótesis que se diseñó<sup>145</sup> en 1964 y todavía mantiene indicaciones fundamentalmente en: estenosis traqueales complejas con compromiso subglótico extenso, soporte de las reconstrucciones traqueales quirúrgicas, y en lesiones traqueales agudas. Consiste en una prótesis de silicona flexible en forma de T compuesta de una rama vertical que se coloca tutorizando la tráquea y una rama horizontal colocada a nivel del trayecto de traqueotomía. Esta prótesis permite la tutorización de la tráquea tras su dilatación, aplicación de laser o en el postoperatorio de cirugía de la vía aérea. La rama horizontal a través del traqueostoma permite la aspiración de secreciones como en una traqueostomía común además de permitir la fonación manteniendo permeable la tráquea en dirección craneal hacia las cuerdas vocales. La complicación clásica de esta prótesis es la obstrucción de la prótesis



por secreciones y la formación de tejido de granulación en los extremos de la prótesis<sup>146,147</sup>.

#### Prótesis de Dumon (Novatech; Aubagne, Francia)

Dumon diseñó en 1990 la primera prótesis de silicona para la vía aérea<sup>148</sup> consistente en un tubo cilíndrico hueco de silicona con pequeñas excrescencias sobre la superficie externa en contacto con la vía aérea que permiten su anclaje. Su colocación con broncoscopio rígido es relativamente sencilla así como su extracción por lo que su uso está ampliamente extendido. Por el contrario presenta facilidad para la migración<sup>149,150</sup>, así como la retención de secreciones y formación de granulomas en los extremos proximal y distal<sup>151-153</sup>.

#### **C) Prótesis reabsorbibles o biodegradables.**

Las endoprótesis biodegradables son dispositivos formados por una fibra polimérica, generalmente polidioxanona, que se degrada tras un tiempo variable. Su ventaja fundamental es que hace innecesaria una eventual extracción broncoscópica de la prótesis ya que desaparece por completo. Como norma general, mantienen su resistencia biomecánica durante 6-7 semanas y se reabsorben completamente a las 14-16 semanas. Debido a su duración temporal las posibles indicaciones podrían incluir estenosis de las vías respiratorias secundarias a complicaciones anastomóticas relacionadas con el trasplante de pulmón<sup>154</sup>, fístulas de la vía aérea o estenosis benignas potencialmente curables<sup>155</sup>. Se ha descrito también su uso en pacientes pediátricos con traqueobroncomalacia<sup>156</sup>. Aunque sus ventajas son indudables y resultan prometedoras, no están exentas de complicaciones<sup>157</sup>.

#### **D) Prótesis liberadores de fármacos**

Los dispositivos liberadores de fármacos están actualmente en desarrollo. Estas prótesis contienen compuestos (Paclitaxel) que previenen la granulación del tejido al inhibir el crecimiento de fibroblastos<sup>158,159</sup>. Las posibilidades terapéuticas de este tipo de endoprótesis son enormes y constituyen una línea de investigación muy relevante.

#### **Complicaciones y riesgos de las prótesis endoluminales**

La mayoría de las endoprótesis en la vía aérea son inicialmente bien tolerados. Sin embargo, las complicaciones relacionadas con estos dispositivos son comunes (hasta en un tercio de los casos)<sup>137,138</sup> y aunque se han descrito complicaciones potencialmente mortales, estas son infrecuentes<sup>160</sup>.

Existe una amplia experiencia en el uso de las prótesis de silicona, siendo de elección en indicaciones como la traqueomalacia donde a pesar de la necesidad de anestesia general y broncoscopia rígida para su colocación, en ocasiones dificultosa<sup>161</sup> puede producir una mejoría inmediata<sup>162</sup>. La amplia serie publicada por Dumon<sup>151</sup> cifra como sus complicaciones más frecuentes la migración en 15%, la formación de granulomas en el 18% y la obstrucción por retención de secreciones en el 8%. Otros autores recogen tasas de complicaciones similares<sup>152,153</sup>. La migración generalmente se debe a una tos violenta o persistente o la resolución de la compresión extrínseca que mantuvo la endoprótesis en posición. Las prótesis pueden migrar en sentido proximal o distal. La migración proximal hacia la laringe puede causar ronquera, pérdida de

la voz, tos o disnea y, rara vez, obstrucción. La migración de manera distal puede causar disnea, tos y obstrucción de un bronquio lobar para provocar atelectasia o neumonía. El dispositivo puede provocar una reacción inflamatoria local, dando lugar al crecimiento del tejido de granulación en los extremos proximal y distal. Esta es principalmente una complicación tardía que se produce semanas o meses tras su colocación y, aunque es más problemática en las prótesis metálicas no recubiertas, también puede desarrollarse en las prótesis de silicona. La obstrucción de la prótesis también puede ocurrir debido a las secreciones respiratorias acumuladas. Si bien en la mayoría de las ocasiones los pacientes pueden expectorar las flemas, algunos casos de impactación mucosa severa pueden precisar broncoscopia urgente de limpieza. Aunque hay experiencia en el uso de prótesis metálicas tipo Gianturco y Wallstent en casos de estenosis benigna de la vía aérea<sup>139, 163-167 (28-34)</sup> su uso en ésta indicación es objeto actualmente de controversia debido a las complicaciones potencialmente graves en caso de recolocación o extracción<sup>168</sup>, por lo que están en prácticamente en desuso aunque algunos autores las contemplan en casos de fracaso con prótesis de silicona<sup>169</sup>. Con las prótesis metálicas recubiertas, híbridas, existe una menor experiencia en su empleo. Han presentado resultados similares a las prótesis de silicona en el tratamiento de estenosis benignas de la vía aérea<sup>170-172</sup> aunque otros autores observan una elevada tasa de migración<sup>140</sup>. Otras posibles complicaciones propias de las prótesis metálicas son la posibilidad de fractura de la malla, con riesgo de migración del material o perforación de la pared de la vía aérea<sup>168</sup>.

	<b>Prótesis de silicona</b>	<b>Prótesis metálicas no recubiertas</b>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Firmes y duraderas: resisten la compresión extrínseca del tumor, evitan las fracturas.</li> <li>• Riesgo menor de tejido de granulación e infiltración del tumor. Aunque el tejido de granulación y el tumor pueden desarrollarse en los extremos proximal y distal</li> <li>• más fáciles de recolocar y retirar</li> <li>• Menos costosos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suelen precisar broncoscopia flexible</li> <li>• Excelente relación de diámetro interno - externo)</li> <li>Escasa migración</li> <li>• Menor impacto en el aclaramiento mucociliar.</li> </ul>
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Migración</li> <li>• Suele requerir broncoscopia rígida y anestesia general</li> <li>• Aclaramiento mucociliar disminuido - riesgo de tapones de moco, impactación e infección.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Riesgo de perforación de vía aérea y vascular</li> <li>• Gran dificultad para retirar o recolocar</li> <li>• Mayor frecuencia de crecimiento de tejido de granulación o tumor a través de los espacios de la malla y obstrucción de la endoprótesis</li> <li>• menos duraderas, se pueden fracturar</li> <li>• Más caras.</li> </ul>

**Tabla 1:** Tipos de endoprótesis y sus potenciales beneficios e inconvenientes.

#### **4.1.2.3. Terapia laser**

El término láser es un acrónimo para “Light Amplified Stimulated Emission of Radiation”. Desde su teórica descripción por Einstein en 1917, su uso en diferentes ámbitos se ha ido desarrollando en los últimos años y desde el descubrimiento de la capacidad de las fibras ópticas para transmitir el láser se ha desarrollado su uso para el tratamiento por vía endoscópica de lesiones de la vía aérea. La elección de un determinado tipo de láser dependerá del tejido a tratar y del objetivo diagnóstico o terapéutico. La penetración del láser en los tejidos dependerá de la capacidad de estos para reflejar, absorber o difundir el láser<sup>173</sup>. Los efectos tisulares pueden ser fototérmicos, fotoquímicos y fotoacústicos<sup>174</sup>.

##### *Efecto Fototérmico*

Consiste en transformar la energía absorbida en calor que genera en los tejidos destrucción por coagulación, carbonización, vaporización y/o combustión. El daño térmico celular mortal ocurre cuando se produce una desnaturalización enzimática a unos 43°-45°C<sup>175</sup>. Las altas temperaturas desencadenan efectos en el tejido, por ejemplo, el cambio del color propio del tejido a pálido o blanco por desnaturalización de las proteínas. El láser es absorbido por los tejidos en función de su coloración; así un tejido pálido y poco vascularizado deja pasar el rayo sin lesionar su superficie pero pudiendo causar daño en profundidad.

##### *Efecto Fotoacústico*

La irradiación del láser liberado en pulsaciones de  $10^{-6}$  o menores introduce rápidamente altos niveles de energía en el sustrato, esto conduce a

un rápido calentamiento y expansión del punto impactado creando una onda de choque que puede producir disrupción o ablación del tejido incidido sin que haya reacción térmica ni química patentes<sup>176</sup>. Las ondas de choque pueden ser generadas por una rápida expansión térmica del tejido irradiado produciendo disrupción de los componentes del tejido, y desencadenando la fragmentación explosiva de las células, organelas y matriz extracelular.

### *Efecto Fotoquímico*

La aplicación de los efectos de la luz más una sustancia sensibilizante con fines terapéuticos se denomina fotoquimioterapia o terapia por fotorradiación. La reacción fotodinámica obtenida por la luz más un sensibilizante en presencia de oxígeno produce una serie de cambios estructurales en las células que puede conducir a la destrucción del tejido.

Gracias a estos efectos de corte y coagulación el láser es útil en el tratamiento de obstrucciones endotraqueales y endobronquiales benignas debidas a estenosis, cuerpos extraños, granulomas, al margen de otro tipo de obstrucciones de origen tumoral con capacidad de hemostasia en caso de tumores sangrantes<sup>177</sup>. Las estenosis traqueales son una indicación frecuente generalmente post-intubación o postraqueotomía pero pudiendo deberse a otras etiologías<sup>178</sup>. En las estenosis traqueales de origen benigno, la terapia láser y/o dilatación de las lesiones puede ser un tratamiento inicial, a partir del cual puede constituirse un tratamiento de laserización repetido en las estenosis cortas y diafragmáticas sin destrucción del soporte cartilaginoso traqueal ni malacia, con posterior colocación de una endoprótesis si aparece una reestenosis<sup>139, 179-180</sup>.

Otra opción es plantear una reconstrucción quirúrgica definitiva tras un tratamiento inicial con láser como primera medida para restituir la funcionalidad de la vía aérea y estabilizar al paciente. Las lesiones no malignas más adecuadas para la resección broncoscópica con láser son estenosis intraluminales cortas (es decir, <4 cm), en particular las asociadas con sangrado concomitante<sup>178</sup>.

Las contraindicaciones principales para el tratamiento con láser son: compresión extrínseca sin componente endoluminal, trastorno cartilaginoso (traqueobroncomalacia), pacientes con oxígeno de alto flujo ( $FiO_2 > 0,4$ ) y lesiones extensas o distales (> 4 cm de longitud), que afectan a la vía aérea distal, o lesiones con evidencia de obstrucción significativa<sup>178</sup>.

### **Tipos de láser**

Existe una amplia variedad de tipos de láser de uso clínico. Cada tipo de láser actúa de un modo determinado dependiendo de la sustancia que se emplee como medio emitiendo luz con longitudes de onda variables. El primer láser usó un cristal de rubí sintético como medio iónico. Ahora, los más comúnmente usados son el argón, kriptón, pigmentos orgánicos fluorescentes, vapor de oro, helio-neón, titanil fosfato de potasio (KTP), CO<sub>2</sub>, YAP (Yttrium, aluminio, fósforo) una combinación de erbio y neodimio o láser ND-YAG y el más reciente, láser de diodos. Cada uno tiene un balance diferente entre las propiedades de corte y coagulación. Nd-YAG láser es el más frecuentemente usado por sus buenas propiedades de coagulación y resección.

El láser de CO<sub>2</sub> fue el primero que se utilizó en la vía aérea<sup>181</sup>. Su longitud de onda de 10,600 nm le confiere una muy buena absorción tisular y una escasa dispersión, sin embargo la escasa capacidad de coagulación en vasos mayores de 0.5 mm de diámetro y su incapacidad de transmitirse por fibra óptica ha limitado su uso en vía aérea. El láser ND-YAG es la mejor opción para resección en la vía aérea. Con una longitud de onda de 1064 nm, fuera del espectro visible, ofrece un excelente poder de coagulación y una gran penetración en profundidad del tejido. Puede usarse a través de una fibra óptica permitiendo su uso tanto en broncoscopio rígido como flexible. Dado que el haz no está en el rango visible, se añade un láser de haz rojo de Helio-Neón permitiendo su visibilidad. Su penetración es de más o menos 6 mm y coagula vasos de alrededor de 2 mm de diámetro<sup>182</sup>. El láser de titanil fosfato de potasio (KTP) se obtiene duplicando la frecuencia de un láser YAG por medio de un cristal de kriptón, consiguiéndose la emisión de una luz verde en la longitud de onda de 532 nm. A potencias altas (10- 12 watos), ofrece vaporización intensa y a potencias más bajas (2-3 watos) puede ser utilizada para devascularizar determinadas zonas<sup>183</sup>. Los láseres de argón tienen un haz débil de unos pocos watos. Su longitud de onda es 514 nm, en el espectro azul-verde, y puede transmitirse a través de fibras ópticas. Dado que su color es azul, gran parte de su energía se absorbe en la hemoglobina. Sus efectos son similares a los del láser KTP a baja potencia<sup>184</sup>. Los novedosos láseres de diodos aportan grandes ventajas sobre los existentes. Su tamaño, mucho más pequeño, así como su gran potencia y versatilidad hacen que su empleo en el campo respiratorio se haya extendido universalmente. El medio activo es un chip milimétrico que hace que este láser sea de tamaño reducido y



muy manejable. Están disponibles en dos longitudes de onda: la de 810 nm para tratamientos de fotorresección y el de 630 nm para terapia fotodinámica<sup>185</sup>.

### **Complicaciones y riesgos del uso del láser**

Las complicaciones de la resección broncoscópica con láser son en general poco frecuentes y ocurren en aproximadamente el 2% de los casos<sup>182,186</sup>, siendo la hemorragia y la perforación de las vías respiratorias las más comunes. Las complicaciones más raras incluyen: deflagración en la vía aérea, embolia aérea y muerte. Hay descritas varias complicaciones graves con el uso del láser ND YAG tales como: hemorragia, ignición en el árbol traqueobronquial, neumotórax, fístula traqueo-esofágica, perforación bronquial e hipoxemia<sup>187,188</sup>. Otras complicaciones posibles son: trastornos del ritmo cardíaco (relacionados a la hipoxemia), embolismo cerebral y sistémico, y perforación de la vía aérea<sup>189-191</sup>. La hemorragia fatal debida a perforación de la arteria pulmonar con el láser ha sido relacionada con el uso potencias de disparo altas y del fibrobroncoscopio. El riesgo de perforación de la vía aérea se puede minimizar evitando la vaporización agresiva de lesiones grandes descargando el láser perpendicular a la pared de la vía aérea y, en general, aplicando reglas de práctica segura al procedimiento<sup>192</sup>. La ignición o deflagración en la vía aérea es la complicación más temida después del sangrado y, aunque no suele ser grave, en ocasiones puede ocasionar lesiones severas e incluso la muerte. En caso de chispa o llama, es necesario enfriar inmediatamente los tejidos y eliminar cualquier objeto inflamable o cualquier material calentado. Los incendios en las vías respiratorias pueden minimizarse usando baja concentración de oxígeno (<24% FiO<sub>2</sub>), baja potencia de disparo, realizando disparos separados por un tiempo suficiente que

permita disipar calor y humos (láser pulsado), y manteniendo la punta de la fibra láser bien separada del tubo endotraqueal y de la punta del fibrobroncoscopio<sup>193</sup>. Aunque la embolia de aire arterial es rara, el aire puede entrar en las venas bronquiales o sistémicas durante el procedimiento<sup>194</sup>. Los pacientes con embolia gaseosa pueden presentar un colapso cardiovascular repentino o signos y síntomas que sugieren un evento cerebrovascular. El procedimiento debe interrumpirse inmediatamente en caso de sospecha de embolia. Las complicaciones postoperatorias incluyen hipoxemia, retención de secreciones y hemorragia por desprendimiento de coágulos o coagulación inadecuada del lecho tumoral. Otras complicaciones menos frecuentes son el edema pulmonar no cardiogénico y la hiperinsuflación pulmonar focal<sup>195,196</sup>.

## **4.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA ESTENOSIS TRAQUEAL**

### **4.2.1. Antecedentes históricos de la cirugía traqueal**

Las representaciones más antiguas de cirugía traqueal se datan anteriores al 3.600 a.C. en tablillas egipcias en las que se representan intervenciones quirúrgicas en la región cervical que parecen corresponder a la realización de traqueotomías. Hipócrates (460–380 a.C.) hace referencia a la realización de una incisión en la tráquea para sobrepasar obstrucciones y advierte de la posibilidad de lesión de los vasos cervicales durante su realización<sup>197</sup>. En 1546, Antonio Brasavola de Ferrara trató un absceso faríngeo mediante traqueostomía siendo la primera traqueostomía con éxito<sup>198</sup>. La primera publicación propiamente científica describiendo la técnica quirúrgica de

una traqueotomía data de 1620 por Nicholas Habicot y posteriormente existen múltiples referencias bibliográficas sobre técnicas e indicaciones<sup>199</sup>, siendo Lorenz Heister en 1718 el primero en utilizar el término traqueostomía<sup>198</sup>. A pesar de la antigüedad de la traqueostomía, la cirugía laringotraqueal es una de las partes más tardías de la cirugía torácica en desarrollarse. Schüller, Glück y Zeller en 1880 y 1881 realizaron resecciones traqueales y anastomosis con éxito en perros sugiriendo su potencial aplicación en humanos<sup>200,201</sup> siendo Küster en 1886 el primero en realizar una anastomosis de la tráquea cervical tras una resección por estenosis postraumática en humanos<sup>202</sup>. Barclay, en 1957, tras varias publicaciones experimentales de otros autores sobre resección carinal previa, realiza una resección traqueal en humano de alrededor de 5 cm de tráquea con carina asociada para reseca un carcinoma adenoide quístico traqueal y describe la anastomosis terminoterminal del bronquio principal derecho a la tráquea, tras movilización del ligamento pulmonar, y del bronquio principal izquierdo a la pared lateral del bronquio intermediario<sup>203</sup> estableciéndose como técnica estándar de reconstrucción tras carinectomía. En 1964, Ogura y Powers publican la primera resección traqueal que incluye parte de la laringe<sup>204</sup>. En los años posteriores, Hermes C. Grillo<sup>205</sup>, Frederik G. Pearson<sup>206</sup>, Michael Maddaus<sup>207</sup> o Louis Couraud<sup>208</sup> y, en España, Vicente Tarrazona<sup>209</sup>, describen y comienzan a difundir el uso de las distintas técnicas quirúrgicas sobre la vía aérea central.

## 4.2.2. Técnicas quirúrgicas

### 4.2.2.1. Generalidades

A lo largo del siglo pasado se propusieron distintas opciones de tratamiento quirúrgico en función de las diversas afectaciones estenóticas de la vía aérea. Las diversas clasificaciones propuestas se realizaron en función de distintos aspectos de la patología. Así, Cotton en 1984 publica su clasificación de las lesiones estenóticas de la vía aérea, región subglótica, focalizando en el grado de estenosis y el porcentaje de luz remanente<sup>210</sup>. Más adelante, Grundfast añadió a la de Cotton la longitud y consistencia de la lesión<sup>211</sup>. Anand puntualizó ésta última añadiendo en lugar de la consistencia de la lesión, la ubicación de la misma, diferenciando entre glóticas, cervicales y torácicas<sup>212</sup>. Grillo, por su parte, dejando de lado el grado de estenosis propuso una clasificación de técnicas en tres grupos en función de la localización de la lesión: el primero, con ligera afectación de cricoides; el segundo, estenosis subglótica a nivel de cricoides pero con espacio entre la lesión estenótica y cuerdas; y el tercer tipo, la estenosis que se inicia a nivel de cuerdas con escaso espacio para la anastomosis<sup>15</sup>. Igualmente, McCaffrey obviando el grado de estenosis planteó una clasificación en función de la localización glótica, gloto-subglótica y traqueal, y la longitud de la lesión<sup>23</sup>. La clasificación más aceptada en la actualidad se ha realizado en función de este parámetro obviando el calibre traqueal, tal como ya hicieran Grillo o McCaffrey<sup>23,213</sup> dado que el factor que determina el tipo de cirugía a realizar es el punto más proximal de afectación de la lesión con respecto a cricoides y las cuerdas vocales. Más recientemente, Freitag<sup>214</sup> propone una nueva clasificación

en un intento de unificar y homogeneizar las anteriores de cara a poder comparar resultados. Incluye las variables: estructural (exofítica/intraluminal, extrínseca, distorsión y cicatricial) o dinámica (malacia de cartílago, membranosa protruyente), localización incluyendo ambos bronquios principales, grado de estenosis, e incluye además las características de la zona de transición de la estenosis.

Las reglas básicas de la cirugía traqueal, descritas por H. Grillo a mediados del siglo XX, se resumen en estas cuatro premisas: (1) manejo delicado de los tejidos; (2) disección peritraqueal muy cuidadosa; (3) respetar la frágil vascularización traqueal; y (4) realización de una anastomosis sin tensión en tejido sano<sup>215</sup>. En toda cirugía de vía aérea central existen, además, una serie de maniobras comunes que tienen una doble misión: en primer lugar, la identificación y disección de la lesión y, en segundo lugar, la realización de maniobras de liberación de tensión de la anastomosis como son: la disección de la cara anterior de la tráquea, la liberación supra o infrahioidea, y la disección perihiliar pulmonar<sup>216</sup>.

En el caso típico de una estenosis traqueal cervical postintubación, la incisión cutánea es en semiluna con la base cercana al yugulum y convexa hacia éste, entre ambos músculos esternocleidomastoideos con el objeto de formar un colgajo subplatismal que se fija con puntos de tracción al mentón su posición cefálica y a la cara anterior del tórax la caudal. Posteriormente, se procede a la disección en línea media de los músculos pretiroideos. Se identifica el istmo tiroideo y se secciona tras sutura del mismo que queda referenciado y

lateralizado para la posterior disección de la tráquea. Una vez alcanzada la tráquea se procede a su disección. Dicha disección se realiza íntimamente pegada a su pared para así evitar la lesión de los nervios recurrentes laríngeos que, en ocasiones, se encuentran inmersos en el tejido peritraqueal inflamatorio que suelen acompañar a las estenosis. Es conveniente referenciar la tráquea justo en la zona inmediatamente distal al borde inferior de la estenosis para poder traccionar de la misma y evitar lesiones esofágicas. A continuación, se incide el borde distal y se secciona circunferencialmente la tráquea que se libera del esófago en sentido craneal hasta llegar al borde superior de la estenosis para así efectuar la resección completa del segmento estenótico. Durante este procedimiento, la ventilación del paciente se realiza a través del campo operatorio intubando la tráquea distal sana<sup>212</sup>.

#### **4.2.2.2. Procedimientos e indicaciones**

A continuación, se describen los diferentes tipos de estenosis y la técnica quirúrgica más apropiada en cada caso según la clasificación de McCaffrey<sup>23</sup>.

##### **4.2.2.2.1. ESTENOSIS TIPO I: Estenosis traqueal sin afectación cricoidea.**

##### **TÉCNICA: Resección traqueal y anastomosis termino-terminal.**

Se procede a la identificación de la lesión y su resección. Se libera no más de 1 cm de tráquea de cada extremo. Se realiza la sutura empezando en la cara posterior y progresando anteriormente. Se puede hacer la anastomosis con sutura discontinua (puntos sueltos) anudados siempre por fuera de la vía aérea o bien practicar una sutura continua (menos frecuente). El material de sutura recomendado es monofilamento reabsorbible, o multifilamento trenzado también

reabsorbible, tras la observación descrita por Grillo y Donahue en 1996 en la que demostraron que la incidencia de granulomas desciende del 23 al 1,6% al pasar de sutura no reabsorbible a reabsorbible<sup>213</sup>. Una vez realizada la sutura de la cara posterior, se reintroduce el tubo oro o nasotraqueal y se retira el tubo de ventilación por campo operatorio.

**4.2.2.2.2. ESTENOSIS TIPO II. OPERACIÓN DE PEARSON<sup>206</sup>: Afectación anterior de la mucosa del cartílago cricoideo, sin afectar el ventrículo laríngeo, a más de 1.5 cm de cuerdas vocales que son móviles. TÉCNICA: Resección del anillo del cricoides, preservando el sello, y anastomosis término- terminal.**

Se emplea cuando, independientemente de que exista una afectación traqueal, coexiste una afectación de la mucosa del cartílago cricoideo a más de 1.5 cm de cuerdas vocales, las cuales, al menos una, son móviles y funcionantes. Es el tipo de operación más frecuentemente realizada y se considera el “gold standard” para los casos con afectación de la mucosa de la región subglótica con daño del anillo cricoideo. No obstante, cabe destacar ciertas diferencias existentes entre la operación actual y la inicialmente descrita por Pearson. Así, ahora no se trata de identificar los nervios recurrentes laríngeos, no se plica la pars membranosa, y se utiliza material reabsorbible para la sutura. Además, no suele ser estrictamente necesario practicar traqueostomía de descarga.

Una vez realizadas las maniobras habituales ya descritas, si la estenosis alcanza la subglotis se incide el pericondrio externo del cricoides en su línea media. Se localiza el plano subpericondral y se libera y reseca el anillo cricoideo en su totalidad quedando únicamente el sello posterior en lo que al armazón

cartilaginoso del cricoides respecta. A continuación, se reseca la mucosa cicatricial que en estos casos no supera el borde superior del anillo cricoideo. En ocasiones, si en la cara posterior o sello cricoideo se encuentra mucosa dañada se diseca subpericondralmente el borde inferior del sello (pericondrio anterior del sello) despegando la mucosa suprayacente de la cara anterior del lecho cartilaginoso. Se procede a limar el sello con gubias finas con el fin de sobrepasar proximalmente el borde sano de la mucosa y poder realizar una sutura evertida adecuada. Una vez comprobado que no queda ningún segmento estenótico ni con mucosa alterada, se inicia el proceso de anastomosis termino-terminal. La cara posterior se realiza con puntos sueltos de Poliglactina 910 (Vicryl®) de 3/0 anudados por fuera. Se retira la intubación intracampo y se reintroduce un tubo oro o nasotraqueal para terminar la sutura en sus caras laterales y anterior, también con Poliglactina 910 de 3/0. Una de las características de la sutura en las caras laterales es que cada punto de sutura debe incluir el pericondrio externo para así reforzarlo. Las maniobras de descenso laríngeo, si fueran necesarias, y de flexión de la cabeza se practican antes de anudar los puntos anteriores y laterales. Para separar la sutura traqueal del tronco arterial braquiocefálico, de haber tenido que disecar este, se interpondrá tejido vecino como músculo, glándula tiroidea o grasa tímica entre ambos.

**4.2.2.2.3. ESTENOSIS TIPO III. OPERACIÓN DE GRILLO<sup>205, 215</sup> : Afectación**  
**circunferencial de la mucosa cricoidea, sin afectar ventrículo laríngeo, a**  
**menos de 2 cm de cuerdas vocales que son móviles y funcionantes.**  
**TÉCNICA: Resección de anillo de cricoides y de la mucosa del sello,**



**cubriendo el defecto posterior con flap de mucosa de tráquea y anastomosis anterior término-terminal.**

En estos casos, el nivel de la afectación mucosa (sin afectación subyacente del cartílago) en la cara posterior asciende hasta un punto en el que hace falta la elaboración de un colgajo de pars membranosa a expensas de sacrificar la pars cartilaginosa de los dos primeros anillos traqueales del cabo distal. Este colgajo sirve para sustituir la lesión mucosa y, tras la anastomosis, quedará apoyado en el lecho denudado del sello cricoideo. En principio, la técnica se desarrolla exactamente igual que la técnica de Pearson pero al llegar al punto de la disección subpericondral de las aletas laterales del anillo, se continúa por el pericondrio interno del cricoides hacia la cara anterior del sello, creando un plano entre la mucosa y el cartílago, separando al uno del otro. Se reseca la mucosa alterada y se realiza la anastomosis del flap a la subglotis. No se practica resección del sello cricoideo porque se parte de la premisa que el armazón cartilaginoso no está dañado.

La sutura se inicia dando cuatro puntos de Poliglecaprone 25 (Monocryl®) o Polidioxanona (PDS®) de 3/0 o 4/0 (dependiendo del grosor del sello remanente) que se extienden desde la base del flap al límite inferior del sello sin llegar a invadir la luz, es decir, son puntos subtotales y extramucosos. Estos puntos quedarán anudados por detrás de la mucosa y nunca hacia la luz. Sirven para descargar la sutura de tensión. Posteriormente, se procede a una sutura continua de ambos bordes mucosos con polidioxanona o Poliglecaprone 25 4/0 anudando en los extremos de la pars membranosa y por fuera de la luz. En este punto ya tenemos reconstruida la cara posterior de la vía aérea. A continuación, se inicia

la sutura de las caras laterales con Poliglecaprone 25 o Polidioxanona de 3/0 con puntos sueltos y anudados por fuera de la luz de la vía aérea. Opcionalmente, se puede colocar un tutor de Montgomery para estabilizar la reconstrucción traqueal. La rama horizontal del tutor se exterioriza, siempre que se pueda, por una contraincisión realizada dos anillos por debajo de la anastomosis. En caso de haberse colocado, se inicia ventilación por el mismo y se suturan las caras laterales y la anterior con Poliglecaprone 25 o Polidioxanona 3/0. En los casos de resecciones extensas de la vía aérea, se puede exteriorizar por la misma anastomosis o incluso se han utilizado tutores en forma de "Y". Se debe tener la precaución de colocar un tapón en la rama proximal del tutor ya que este extremo quedará ubicado justo por encima de las cuerdas vocales. De no colocarse se producirán en casi todos los casos episodios severos de broncoaspiración de saliva. Se puede optar también por la colocación de una cánula de traqueostomía en vez del tutor de Montgomery.

#### **4.2.2.2.4. ESTENOSIS TIPO IV. OPERACIÓN DE MADDAUS Y PEARSON<sup>207</sup> :**

**Estenosis a menos de 0.5 cm de cuerdas, siendo estas móviles y funcionantes. TÉCNICA: Resección de anillo de cricoides, laringofisura anterior, resección de mucosa del sello y cobertura del defecto posterior con flap de mucosa de tráquea, cierre de la laringofisura y anastomosis anterior término-terminal.**

La técnica de Maddaus y Pearson fue descrita inicialmente como resección subgloto-traqueal con laringoplastia sincrónica e indicada para las estenosis subglóticas tan altas que afectan a la comisura posterior y que requieren para su resección y anastomosis la realización de una laringofisura. El desarrollo de la

técnica es exactamente igual que la técnica de Grillo salvo que al tener que realizar una anastomosis en la base de las cuerdas vocales, se necesitará la práctica de laringofisura para poder desarrollar la sutura con seguridad y con comodidad. Cabe destacar la necesidad de adaptar la sutura a la circunstancia de que se anastomosará una sección distal de forma circular con un cabo proximal que tiene una sección con la cara posterior en forma semicircular y la cara anterior en forma de quilla que corresponde al cartílago tiroides. Además es una sutura en forma de “T” invertida. A nivel de la laringofisura y dependiendo del grosor de las alas del tiroides se usan ocasionalmente sutura de reabsorbible de 2/0.

#### **4.2.2.2.5. ESTENOSIS SUBGLÓTICAS COMPLEJAS CON AFECTACIÓN EXTENSA DEL CRICOIDES Y SU MUCOSA. OPERACIÓN DE COURAUD<sup>208</sup>**

<sup>217</sup> **TÉCNICA:** Resección de anillo de cricoides, laringofisura anterior, resección de la mucosa del sello, laringofisura posterior con o sin interposición de injertos libres y cobertura del defecto posterior con flap de mucosa de tráquea, cierre de la laringofisura anterior con o sin interposición de injerto y anastomosis anterior término-terminal.

Se denominan así a una serie de técnicas que básicamente tienen en común una resección gloto-subglótica con plastia laríngea y anastomosis primaria bajo tubo nasotraqueal o tubo en T de Montgomery. Esta técnica incluye una resección subglótica, o subgloto-traqueal en su caso, llegando hasta el nivel de las cuerdas estenosadas con laringofisura y resección de la mucosa de comisura posterior, y sección interaritenoides y del sello cricoideo remanente. Dependiendo de la estabilidad de las estructuras remanentes y del diámetro

conseguido, se puede añadir la realización de un injerto posterior mucoperióstico suturado a los bordes de la división del sello cricoideo o la colocación del injerto mucoperiástico en la laringofisura en caso de estenosis de comisura anterior. Actualmente, en la mayoría de los casos, la cricotomía posterior con sección interaritenoides sin injerto es suficiente para obtener una buena luz glótica y una menor afectación de la fonación. Inicialmente se utilizaban injertos de pericondrio y periostio pero los largos períodos de consolidación provocaron que a partir de 1990 se sustituyera el pericondrio por injerto de hueso clavicular, bien libre o bien pediculizado con músculo esternocleidomastoideo fijado con cuatro puntos a los bordes del cricoides.

#### **4.2.2.3. Complicaciones de la cirugía laringotraqueal**

La cirugía de resección traqueal y laringotraqueal presenta, en general, buenos resultados a largo plazo consiguiendo restaurar un calibre normal en la vía aérea y preservando la calidad de la voz en más del 95% de los casos<sup>16,218,219</sup>. Sin embargo, a pesar de una mortalidad general baja asociada a las técnicas de resección traqueal y laringotraqueal baja (menor del 3%)<sup>220-222</sup> no están exentas de complicaciones, en ocasiones graves. En la serie más extensa la incidencia de complicaciones se ha cifrado en torno al 18%<sup>220</sup>, si bien en series más recientes se recogen cifras variables entre el 34% y 44%.<sup>223-225</sup>. Las complicaciones pueden ser clasificadas en aquellas relacionadas con la anastomosis traqueal y otras no relacionadas.

#### 4.2.2.3.1. Complicaciones relacionadas con la anastomosis

Se trata de complicaciones locales que pueden comprometer la vida del paciente y con frecuencia conducen al fracaso de la intervención realizada. Pueden aparecer hasta en el 15% de los casos<sup>16</sup>. Las principales complicaciones anastomóticas que se pueden dar son: edema, dehiscencia, aparición de granulomas en la sutura, reestenosis, y la aparición de fístulas a órganos vecinos. Los síntomas típicos de las estenosis (disnea y estridor) pueden no estar presentes o atribuirse de forma errónea a fenómenos inflamatorios postoperatorios. Algunos grupos de trabajo han definido una serie de factores predictores de aparición de complicaciones anastomóticas, entre los que se incluyen<sup>220,223,226</sup> reintervención quirúrgica, diabetes, resecciones mayores de 4 cm, resecciones laringotraqueales, edad inferior a 17 años, necesidad de traqueostomía preoperatoria, y radioterapia previa. La presencia de una traqueostomía previa aumenta considerablemente el riesgo de infección local<sup>227</sup>. En los pacientes que presenten estos factores de riesgo el seguimiento se realizará con especial atención.

#### Edema de la anastomosis

Supone una situación de obstrucción de la vía aérea en función del grado de edema que aparece y es debida a la inflamación de la mucosa traqueal secundaria a la manipulación quirúrgica. El edema que requiere intervención es poco común, aunque su cuantificación precisa es difícil. Piazza et al. han reportado 4 de 137 pacientes (3%)<sup>224</sup>. El edema que causa síntomas obstructivos de la vía aérea es más común después de la resección laríngea. La broncoscopia generalmente es diagnóstica y fundamental para descartar dehiscencias

concomitantes. Los casos leves se tratan con esteroides, diuréticos, epinefrina nebulizada y elevación de la cabeza, pero si existe riesgo de pérdida de la vía aérea es precisa la intubación<sup>220</sup>. El edema que no se resuelve tras algunos días de intubación y terapia médica es una indicación para la traqueostomía,

### **Dehiscencia total precoz**

En casos en los que se ha producido una extensión cervical intempestiva, tos descontrolada o un exceso de tensión en la sutura, puede darse una sección o desinserción de los cartílagos sobre los que se había realizado la sutura, desencadenando una dehiscencia completa de la sutura con la consiguiente discontinuidad de la vía aérea. La sintomatología es grave, con importante disnea, estridor y tiraje, enfisema cervical e intensa fuga por el drenaje. Lo prioritario en estos casos es preservar y controlar la vía aérea y, siempre que el estado del paciente lo permita, realizar un diagnóstico precoz mediante broncoscopia e incluso TAC. Confirmado el diagnóstico de dehiscencia total de la anastomosis, hay que proceder a una reintervención de urgencia para reparar el defecto<sup>220</sup>.

### **Dehiscencia parcial o total tardía**

Como resultado de una infección mantenida del campo operatorio, necrosis por isquemia de los extremos traqueales suturados, o como evolución de una dehiscencia parcial, puede llegar a producirse una dehiscencia total diferida de la anastomosis. El paciente inicialmente puede manifestar únicamente síntomas infecciosos, con o sin estridor, e incluso ausencia de síntomas graves en los casos de dehiscencias tabicadas. Ante esta sospecha, se debe confirmar el

diagnóstico mediante broncoscopia flexible (preferentemente) y TAC. Si se demuestra una dehiscencia significativa debe realizarse una reintervención para cierre primario previo control seguro de la vía aérea. En ocasiones, se utilizan coberturas con colgajos musculares y la colocación de un tubo en T de Montgomery, o una traqueostomía, si hay importante edema laríngeo. Si las dehiscencias son de pequeño tamaño y bien toleradas, puede realizarse un manejo conservador con antibioterapia. Se ha propuesto la terapia con oxígeno hiperbárico para estas situaciones concretas<sup>228</sup>

### **Fístulas traqueoarteriales**

Aparecen generalmente en el postoperatorio tardío y como consecuencia de una dehiscencia de la anastomosis o por el contacto y fricción mantenidos de la arteria con una cánula de traqueostomía o con el drenaje. Afecta típicamente al tronco arterial braquiocefálico<sup>229</sup> aunque también puede hacerlo a otras estructuras vasculares. Se trata de una situación de emergencia en la que la prioridad será asegurar y mantener la vía aérea. Su manejo y control es muy difícil, en especial cuando ha aparecido sin traqueostomía o en paciente no intubado. El control inicial lo realizaremos mediante hiperinflación del balón de la cánula o del tubo endotraqueal a la altura del sangrado para tratar de comprimirlo, y que nos dé el tiempo suficiente para poder hacer un abordaje quirúrgico de emergencia.

### **Recidiva de la estenosis**

La recidiva de la estenosis puede relacionarse con los siguientes factores o situaciones: mala evolución de dehiscencias parciales o totales; infecciones

locales; granulomas mal controlados o por laserización excesiva de los mismos; intolerancia a las suturas utilizadas; por evolución de la enfermedad previa; resección insuficiente de la estenosis inicial o haber realizado la anastomosis sobre tráquea afecta. Las opciones terapéuticas ante la recidiva son: la reintervención quirúrgica, teniendo en cuenta el añadido de dificultad técnica de una reintervención; aplicación de laser mediante endoscopia en los casos de reestenosis de escasa longitud (membranas o diafragmas); y la colocación de endoprótesis, con o sin traqueostomía, en casos sin posibilidad de reintervención o tratamiento definitivo endoscópico<sup>221,222</sup>.

#### **4.2.2.3.2. Complicaciones no anastomóticas**

##### **Alteraciones de la función glótica y deglutoria**

La laringe realiza principalmente tres funciones: (1) la respiración mediante la acción del músculo cricoaritenoso posterior que separa las cuerdas vocales permitiendo el paso de aire; (2) la protección de la vía aérea durante la deglución mediante la adducción de las cuerdas vocales junto con el ascenso de la laringe y el cierre de la epiglotis; y (3) la fonación al producir sonido gracias al aire exhalado en interacción con las cuerdas vocales moduladas por la acción de los músculos intrínsecos de la laringe<sup>230</sup>. Estas funciones se pueden ver alteradas tras la intervención, principalmente por lesión uni o bilateral de los nervios laríngeos recurrentes, lo que conduce a paresia o parálisis de las cuerdas vocales. La lesión verdadera, neurotmesis, del nervio recurrente es infrecuente (14 de 901 en la serie de Wright)<sup>220</sup>. La lesión unilateral ocasiona una parálisis de una de las cuerdas vocales en posición paramediana. Esto apenas afecta al



calibre de la glotis durante la respiración, sin embargo sí ocasiona un defecto del cierre durante la fonación, causando una voz débil, ronca y entrecortada. Del mismo modo, pueden existir problemas durante la deglución con aspiración de saliva y líquidos. La sintomatología dependerá de la posición de la cuerda paralizada, de la gravedad del daño sufrido por el nervio laríngeo recurrente, y del grado de compensación de la cuerda contralateral. El 80% de los pacientes recuperan la voz normal al cabo de unos meses<sup>231</sup>.

La lesión bilateral ocasiona una parálisis de ambas cuerdas vocales en posición paramediana, con muy poca capacidad de separación, comprometiendo la función respiratoria. Requiere una intervención urgente, generalmente con la realización de una traqueostomía. La alteración en los mecanismos de la deglución, que pueden aparecer asociados a alteraciones en las cuerdas vocales, también se han relacionado con la realización de maniobras de liberación laríngea<sup>213,215,232</sup> (maniobra de Dedo: sección de membrana tirohiodea y astas superiores de tiroides, y maniobra de Fishman: descenso suprahioideo). Otras posibles causas son: la realización de laringofisura anterior y la manipulación quirúrgica del sello cricoideo que interfieren en el ascenso laríngeo en la deglución pudiendo dar lugar a broncoaspiraciones, fundamentalmente con líquidos. El tratamiento consiste en el entrenamiento en técnicas de rehabilitación de la función deglutoria, induciendo la tos después de cada deglución para aclarar el material aspirado<sup>225</sup>. En algunos pacientes puede ser precisa la nutrición por sonda nasogástrica o, preferentemente, la colocación de una sonda de gastrostomía percutánea para proceder a la alimentación enteral durante el proceso de rehabilitación<sup>233</sup>.

## 5. PAPEL DEL TGF- $\beta$ EN EL DESARROLLO DE LA ESTENOSIS TRAQUEAL INFLAMATORIA

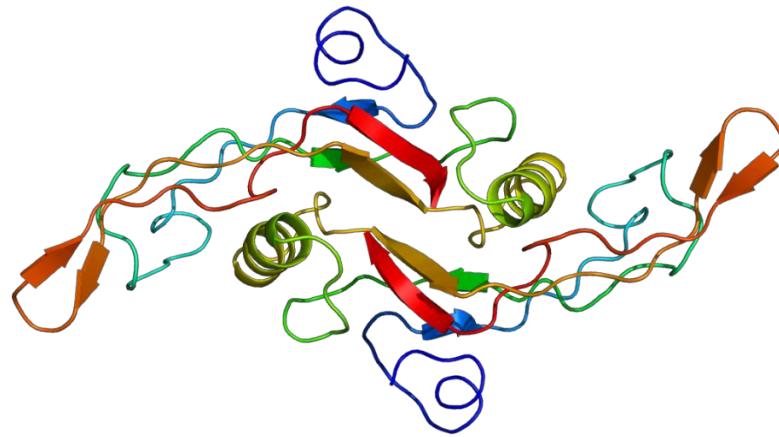
### 5.1. GENERALIDADES DEL TGF- $\beta$ . VIA DE SEÑALIZACION.

En la fisiopatogenia de la estenosis traqueal benigna de origen inflamatorio, se ha reflejado el papel de diversos agentes profibróticos en este proceso. La aplicación de un estrés mecánico sobre la mucosa traqueal tiene una actividad sobre la remodelación de este tejido mediante la producción de factores de crecimiento de las células epiteliales bronquiales. Esto se traduce en un aumento en la síntesis de mediadores con actividad profibrótica, como el TGF- $\beta$  (de *transforming growth factor*-beta) y las endotelinas ET1 y 2<sup>234</sup>, así como el CTGF (de *connective tissue growth factor*), TNF- $\alpha$  (de *tumor necrosis factor-alpha*) entre otros<sup>2</sup> con la consecuente formación de fibrosis subepitelial a este nivel.

Uno de los más relevantes, TGF- $\beta$ , pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3). Son sintetizadas en una amplia variedad de tejidos y actúan como citocinas involucradas en múltiples procesos celulares como hematopoyesis, proliferación celular, angiogénesis, diferenciación, migración y apoptosis celular. Se sintetizan como un complejo peptídico único que se almacena en la matriz extracelular unido a unas proteínas denominadas LTBP (de *latent TGF- $\beta$  binding proteins*), que han de ser degradadas para la correcta acción del factor principal. Dicha degradación ocurre mediante proteólisis extracelular mediada por sustancias

que se sintetizan en estados de inflamación y de daño tisular, por lo que TGF- $\beta$  forma parte del proceso normal de reparación y cicatrización de los tejidos<sup>235</sup>.

De todas las isoformas, TGF- $\beta$ 1 es la molécula con una función más amplia. Es una proteína homodimérica, producida por una gran variedad de células, como plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. Se sintetiza a partir del gen *tgfb* localizado en el cromosoma 19, locus q13.2 (Cr.19q13.2). Es una proteína de 25 kDa caracterizada como un precursor proteico inactivo de gran tamaño (de unos 390 aminoácidos) que tras la escisión proteolítica genera la proteína activa de 112 aminoácidos<sup>236</sup>.



**Figura 1:** Representación molecular de TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$ 1 ejerce su acción mayoritariamente en el tejido conectivo, endotelial y hemático mediante una unión de alta afinidad a sus receptores TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII y TGF- $\beta$ RIII en la superficie de estas células, y al receptor endoglin en las células endoteliales<sup>237</sup>. La molécula de TGF- $\beta$  se une al TGF- $\beta$ RIII, que posteriormente lo presenta al TGF- $\beta$ RII, activándolo. Una vez activo, TGF- $\beta$ RII se une y transfosforila a TGF- $\beta$ RI, estimulando su actividad proteinquinasa<sup>238</sup>. Estos receptores del tipo serina/treonina quinasa, tienen un dominio

extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático rico en serina/treonina. La unión del ligando TGF- $\beta$  causa la rotación de los receptores de tal modo que su dominio quinasa citoplasmático se orienta a una conformación catalíticamente favorable. El receptor TGF- $\beta$ R2 fosforila los residuos serina del receptor TGF- $\beta$ R1, activándolo<sup>239</sup>. Dicha unión activa una serie de cascadas intracelulares, en las que participan las proteínas Smad y las MAP (de *mitogen activated protein*) quinasas entre otras, hasta la llegada de la información al núcleo celular.

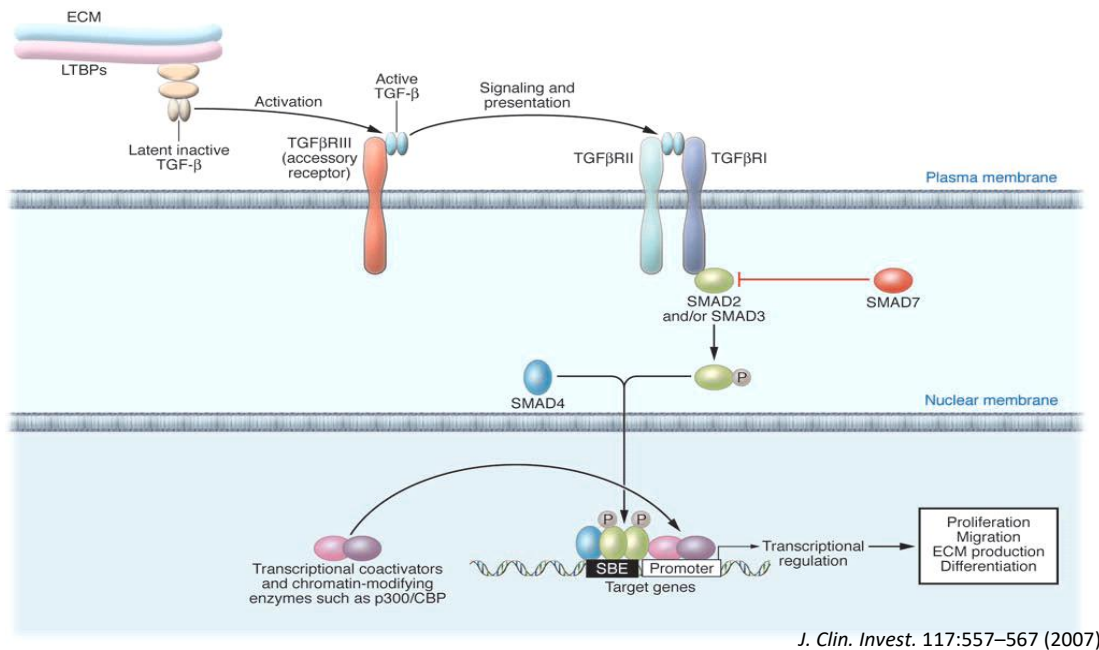
Las proteínas Smad constituyen una familia de proteínas que funcionan a nivel celular como segundo mensajero propagando señales intracelulares que se transducen en acciones extracelulares con la participación de TGF- $\beta$  hasta el núcleo celular donde activan la transcripción de genes específicos regulando la expresión de los mismos<sup>240-246</sup>. En los mamíferos existen ocho proteínas Smad, agrupadas en tres subfamilias<sup>240</sup>:

- Smad reguladas por el receptor (R-Smad): Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8.
- Smad mediadora común (Co-Smad): Smad4.
- Smad inhibitorias (I-Smad): Smad6 y Smad7.

Las proteínas R-Smad tienen en su extremo carboxilo terminal un motivo rico en serina (SXS) que es el sitio de fosforilación para su activación<sup>247</sup>. Smad2 y Smad3 son específicas en la transmisión de señales desde el receptor TGF- $\beta$  junto con el mediador común Smad4. Por el contrario, Smad7 interactúa con el

receptor TGF- $\beta$  bloqueando la transducción de la señal dependiente de Smad, sirviendo como mecanismo de regulación negativa<sup>248</sup>.

La unión de TGF- $\beta$  a sus receptores induce la activación de varias cascadas de señalización, siendo la ruta de las Smads la más específica de la familia de TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  se une a su receptor TGF- $\beta$ RII, induciendo la fosforilación del receptor TGF- $\beta$ RI, cuya actividad serina-treonina quinasa fosforila a las proteínas Smad activadoras (Smad-2 y -3) que forman heterocomplejos con Smad-4<sup>249-252</sup>. En esta forma se translocan al núcleo donde reconocen y se unen a los SBE (de *Smad-binding elements*), reclutando factores transcripcionales y permitiendo la transcripción de genes específicos<sup>253-255</sup>. Los SBE se encuentran en los promotores de muchos genes inducibles por TGF- $\beta$ , incluyendo los de las proteínas asociadas a la producción de los componentes de la matriz extracelular como diferentes colágenos,  $\alpha$ -SMA (de *alpha smooth-muscle actin*) y CTGF (de *connective tissue growth factor*), factores de crecimiento y factores anti-apoptóticos que participan en los procesos de proliferación, migración y diferenciación (Figura 2).



**Figura 2.** Ruta de señalización mediada por TGF- $\beta$ .

## 5.2. FUNCIONES DEL TGF- $\beta$

Como se ha comentado, TGF- $\beta$  se encuentra implicado en la regulación de la transcripción de genes asociados con la cicatrización y producción de la matriz extracelular. Sin embargo, también tiene una importante actividad sobre el control del ciclo celular y regulación sobre la apoptosis así como en la regulación del sistema inmune. Secundariamente a estas funciones, la desregulación de algunas o varias de ellas conducen al desarrollo de neoplasias o a la progresión de las mismas, por lo que también se atribuye al TGF- $\beta$  una función supresora de tumores en condiciones normales y oncogénica en caso de determinadas alteraciones de dicha vía de señalización.

### 5.2.1. Fibrosis y cicatrización

TGF- $\beta$  es un factor pleiotrópico sintetizado por muchas células en el organismo como un agente fibrogénico importante que regula el proceso tanto fisiológico (cicatrización de heridas y reparación tisular) como patológico de fibrogénesis, mediante la estimulación de la quimiotaxis de fibroblastos y su diferenciación en miofibroblastos los cuales, a su vez, son la mayor fuente de TGF- $\beta$  durante el proceso fibrótico, activándose de forma autocrina y paracrina e induciendo la activación de otros fibroblastos. La consecuencia final es el aumento de producción de componentes de la matriz extracelular, como los colágenos de tipo I, III, V y VI, al igual que de otras proteínas tales como fibronectina y  $\alpha$ -SMA este último siendo un marcador molecular de miofibroblastos activados. Por otro lado, es capaz de disminuir la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular, incluyendo colagenasa, heparinasa, estromelisina y metaloproteasas<sup>256</sup>, y aumenta la producción de proteínas que inhiben las enzimas que degradan la matriz extracelular, incluido el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y el inhibidor tisular de metaloproteasa. Además, modula la producción de una serie de citoquinas que estimulan la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) por los fibroblastos (mediante la fosforilación de Smad3 y MAP-K<sup>257</sup>), que a su vez estimula la proliferación de células epiteliales, su migración y angiogénesis, procesos protagonistas en la reparación de los tejidos. Por todo ello, TGF- $\beta$  se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis en varios procesos de inflamación crónica, sobre todo en los pulmones, los riñones y el hígado. Además, se observa una expresión elevada de TGF- $\beta$  en cicatrices hipertróficas, síndromes de esclerosis sistémicas y en el síndrome de Marfán<sup>258-260</sup>.

### 5.2.2. Regulación del ciclo celular

En la mayoría de las células epiteliales, TGF- $\beta$  es un potente inhibidor del crecimiento celular. Mantiene el ciclo celular en fase G1 estimulando la expresión de inhibidores de las familias CIP/KIP e INK4/ARF e inhibiendo la función o producción de proteínas esenciales reguladoras del ciclo celular como CDK (de *cyclin-dependent kinases*) 2 y 4 y ciclinas A y E9<sup>261</sup>. Estos cambios dan como resultado una fosforilación disminuida del producto del gen del retinoblastoma (Rb) que le permite unirse y secuestrar a los miembros de la familia de factores de transcripción E2F. E2F secuestrado es incapaz de estimular la expresión de genes que regulan la progresión a través del ciclo celular, como *cmyc* y *bmyb*. En las células neoplásicas, las alteraciones en la ruta de TGF- $\beta$  confiere resistencia a la inhibición del crecimiento por TGF- $\beta$ , lo que permite la proliferación incontrolada de las células.

A nivel mesenquimal, las células tumorales resistentes a TGF- $\beta$ , que proliferan de manera no regulada, así como las células estromales circundantes (fibroblastos), aumentan la producción de TGF- $\beta$ , que actúa sobre las células endoteliales favoreciendo la angiogénesis, aumentando así la capacidad invasiva del tumor, lo que proporciona una ventaja adaptativa a las células tumorales. Se ha observado que la delección *in vitro* dirigida de TGF- $\beta$ 1 o de los receptores de TGF- $\beta$  tipo II produce una disminución de la vasculogénesis asociada con una diferenciación defectuosa del endotelio capilar y una formación inadecuada de tubo capilar<sup>262,263</sup>. Además, la expresión de la endogлина del receptor de TGF- $\beta$  aumenta mucho durante la angiogénesis<sup>264</sup>



### 5.2.3. Regulación del sistema inmune

TGF- $\beta$ 1 juega un importante papel en el control del sistema inmune y muestra diferentes actividades en diferentes tipos de células, o en diferentes estadios de desarrollo de la célula<sup>265</sup>. La mayoría de las células inmunes (o leucocitos) secretan TGF- $\beta$ 1<sup>266</sup>.

La función fundamental del TGF-  $\beta$  en el sistema inmune es mantener la tolerancia mediante la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos<sup>267</sup>. TGF-  $\beta$  regula la selección de células T tímicas y mantiene la homeostasis del conjunto de células T “naive”. TGF-  $\beta$  inhibe los linfocitos T citotóxicos, la diferenciación de células Th1 y Th2 del mismo modo que controla la proliferación, supervivencia, activación y diferenciación de células B, así como el desarrollo y funciones de las células “natural killer”, los macrófagos, células dendríticas y granulocitos<sup>268</sup>. Además, el TGF- $\beta$  controla el inicio y la resolución de las respuestas inflamatorias mediante la regulación de estímulos quimiotácticos para la migración de leucocitos la activación y la supervivencia de los linfocitos, las células NK, las células dendríticas, los macrófagos, los mastocitos y los granulocitos, además de regular la localización mediada por las moléculas de adhesión de estas células<sup>267</sup>.

Colectivamente, TGF-  $\beta$  juega un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia periférica contra antígenos propios e inocuos, como alimentos, bacterias comensales y aloantígenos fetales así como en el control de las respuestas inmunes a los patógenos<sup>268</sup>.

#### 5.2.4. Supresión tumoral/oncogénesis en cáncer humano

Como se ha comentado, en las células normales, TGF- $\beta$  actúa como un supresor tumoral inhibiendo la proliferación celular o promoviendo la diferenciación celular o la apoptosis. En las etapas iniciales de la tumorigénesis, una célula pierde su inhibición del crecimiento mediada por TGF- $\beta$  como resultado de la mutación o pérdida de expresión de los genes para uno o más componentes de la ruta de señalización de TGF- $\beta$ <sup>269,270</sup>.

Las mutaciones en la vía de señalización de TGF- $\beta$  se demostraron inicialmente en el receptor de tipo II, cuando se descubrió que varios cánceres tenían mutaciones o pérdida de expresión de este receptor<sup>271,272</sup>. La región codificante del gen para este receptor tiene una secuencia de 10 nucleótidos de adenina consecutivos; la adición o eliminación de una adenina dentro de esta región da como resultado la producción de un receptor truncado, funcionalmente inactivo. Además, la reexpresión del receptor tipo II restaura la sensibilidad del TGF- $\beta$  y reduce la formación de tumores en las células que han perdido su sensibilidad a TGF- $\beta$  debido a mutaciones en el receptor de tipo II<sup>273</sup>, por lo que parece clara la relación entre el gen para el receptor de tipo II y la función supresora tumoral humana.

Las mutaciones que dan como resultado la pérdida de función o la producción disminuida del receptor de tipo I o de las moléculas de señalización de TGF- $\beta$  Smad2 y Smad4, también se han identificado en cánceres humanos<sup>274-276</sup>. Además de las mutaciones en los componentes de señalización de TGF- $\beta$  descritos anteriormente, muchas oncoproteínas celulares, como p53, myc, e1a,

RAS, y SKI<sup>277-281</sup> pueden inhibir la señalización de TGF- $\beta$  y superar la inhibición del crecimiento inducida por TGF- $\beta$ .

#### **5.2.5. Progresión tumoral**

Después de que las células tumorales se vuelven resistentes a la inhibición del crecimiento por TGF- $\beta$ , tanto las células tumorales como las estromales dentro de los tumores a menudo aumentan su producción de TGF- $\beta$ . En respuesta al aumento de la producción de TGF- $\beta$ , las células tumorales (cuyo crecimiento ya no puede ser inhibido por TGF- $\beta$ ) se vuelven más invasivas y desarrollan mayor capacidad de metástasis a distancia gracias a la angiogénesis y mayor motilidad celular<sup>282</sup>, supresión del sistema inmune y aumento de la interacción de las células tumorales con la matriz extracelular mediada por TGF- $\beta$  que se ha observado en los últimos estadios de algunas neoplasias<sup>283</sup>.

Con la intención de inhibir la señalización de TGF- $\beta$ , se han descrito en la literatura diversas vías o moléculas. P17 es un péptido sintético con capacidad de inhibición de TGF- $\beta$  de alta eficacia mediante un mecanismo de unión y bloqueo al propio TGF- $\beta$  impidiendo su unión al TGF- $\beta$ RIII.

### **5.3. VIA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT**

La vía JAK/STAT es una vía intracelular de regulación de la expresión génica que se activa por diversos ligandos a receptores celulares JAK y tiene un importante papel en la actividad reguladora de la respuesta inflamatoria<sup>284</sup>. Las

proteínas JAK son una familia de 4 proteínas con actividad tirosina-quinasa (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2)<sup>285</sup> con longitudes algo mayor a mil aminoácidos y masas moleculares que oscilan entre 110 a 140 kDa<sup>286</sup>. Los cuatro miembros de la familia JAK tienen una estructura similar y están compuestos por varios dominios<sup>287</sup>:

**Dominio FERM:** localizado en el extremo amino terminal, denominado así por las proteínas que lo componen (ezrina, radixina y moesina). Consiste en tres subdominios (F1-F3) que intervienen en la unión de la proteína con las membranas (300 aminoácidos). Está involucrado en la asociación de las proteínas JAK con los receptores celulares, así como su propia autorregulación<sup>288</sup>.

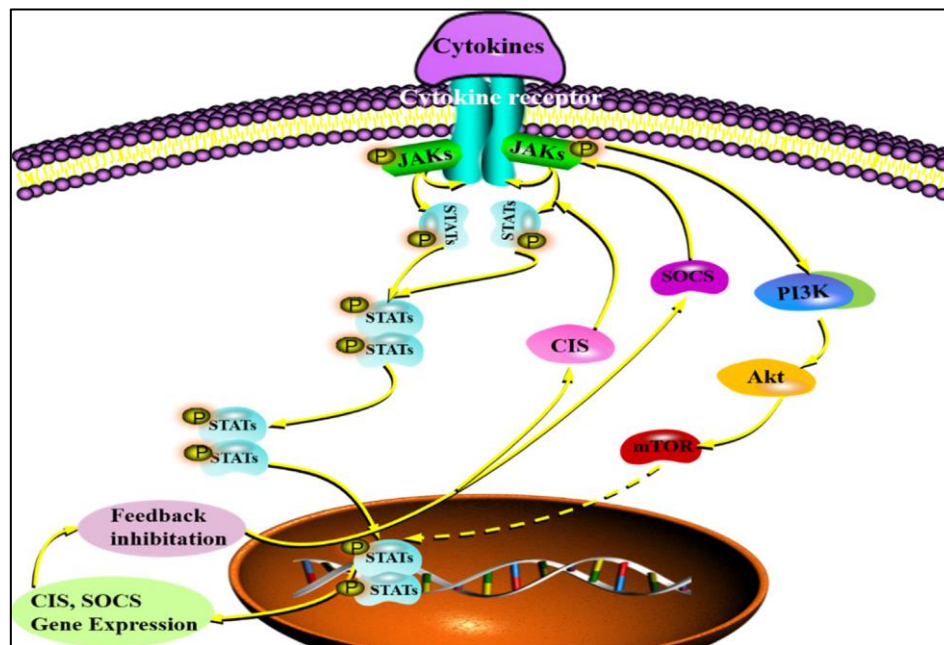
**Dominio SH2:** Se une a los péptidos que contienen fosfotirosina mediante puentes de hidrógeno (100 aminoácidos).

**Dominio pseudoquinasa JH2:** recibe su nombre por su homologo tirosinquinasa (PTK) pero sin actividad catalítica y con un papel regulador. Su actividad bioquímica aún no ha sido claramente determinada.

**Dominio quinasa JH1:** consiste en un residuo de unos 250 a 300 aminoácidos localizada en el extremo carboxilo terminal siendo la única zona de la proteína con actividad enzimática conocida con actividad tirosina quinasa<sup>289</sup>.

En la vía JAK/STAT, la llegada del ligando (moléculas del tipo interferón, interleucinas o diversos factores de crecimiento)<sup>290</sup> y su interacción con el dominio extracitoplasmático del receptor de la membrana celular genera la fosforilación de los residuos de tirosina de dicho receptor por parte de las

proteínas JAK a nivel intracelular, creando así sitios de unión para las propias proteínas JAK mediante sus dominios SH2. Estos sitios SH2 permiten la llegada y unión de proteínas STAT (de *signal transducer and activator of transcription*) a los residuos de fosfotirosina del receptor. Se han descrito siete moléculas de la familia STAT en mamíferos, cada una de ellas con funciones específicas (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6)<sup>291</sup>. Cuando las proteínas STAT se han unido al receptor JAK vuelve a activar su función tirosina-quinasa y fosforilan a STAT. Como consecuencia de esto, las proteínas STAT se disocian del receptor y se unen formando un dímero (dimerización) el cual posteriormente se mueve hacia el núcleo celular en donde se une al ADN y actúa promoviendo la transcripción de genes relacionados con la señalización del ligando<sup>292</sup> (Figura 3).



*Int Immunopharmacol Mar;80 106210*

**Figura 3.** Descripción general del mecanismo de regulación de la vía JAK / STAT.

La regulación molecular de la vía JAK/STAT se realiza mediante varios mecanismos. Uno de los más relevantes es el relacionado con la familia de las

proteínas supresoras de la señalización de citoquinas o SOCS. Esta familia de proteínas inhibe la fosforilación de STAT mediante la unión a la región inhibidora de actividad quinasa inhibiendo directamente la actividad tirosin-quinasa de las proteínas JAK o compitiendo con las proteínas STAT por los sitios de unión fosfotirosina del receptor de citoquinas<sup>293</sup>.

La regulación de la vía JAK/STAT se ha relacionado con el desarrollo de patología de origen inflamatorio y autoinmune, como en el caso de artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica, alopecia areata, espondilitis anquilosante, enfermedad de Chron o Lupus eritematoso sistémico entre otras<sup>294</sup>, así como en otros procesos como la enfermedad de Parkinson, sepsis u oncogénesis<sup>295</sup>.

La activación por citoquinas de la vía JAK/STAT se ha demostrado asociada a la activación de TGF- $\beta$  en diversos estudios<sup>294,296,297</sup>. El TGF- $\beta$  puede regular la señalización a través de la vía JAK/STAT de manera positiva o negativa según el tipo de célula. Además, la biodisponibilidad de algunas de las citoquinas cuya actividad se realiza a través de la vía JAK/STAT como las IL (de *interleukins*), TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  es regulada por TGF- $\beta$  por lo que la actividad de ambas está directamente relacionada en múltiples procesos<sup>298</sup>. A nivel hepático, las células estrelladas activadas producen CTGF en respuesta a TGF- $\beta$  para promover la fibrosis hepática, y este proceso puede ser mediado por STAT3<sup>299</sup>. A nivel renal se ha observado que la hiperglucemia provoca el crecimiento de células mesangiales glomerulares, estimula la producción de TGF- $\beta$  y una mayor síntesis de proteínas de la matriz como la fibronectina, lo que contribuye a la nefropatía diabética y además provoca una activación de JAK2 y STAT1, STAT3 y STAT5<sup>300</sup>. La IL-7 en modelos de fibroblastos y fibrosis pulmonar también

induce la expresión de Smad7 como inhibidora a través de la vía JAK1/STAT1 e inhibe las funciones pro-fibróticas de TGF- $\beta$ <sup>301</sup>. En la glándula mamaria, la acción de la prolactina, a través de JAK2 y STAT5, permite la alveologénesis y lactancia. TGF- $\beta$  inhibe la acción de la prolactina bloqueando la proliferación epitelial mamaria y diferenciación ya que el complejo Smad2/3/4 inhibe la actividad de STAT5 bloqueando su interacción con el coactivador de transcripción CBP, inhibiendo la diferenciación de la glándula mamaria y lactancia<sup>302</sup>. En los linfocitos T, TGF- $\beta$  inhibe la activación de JAK2 y posterior fosforilación y activación de STAT3 y STAT4 inducida por IL-12<sup>296,297</sup>. En células epiteliales del tracto digestivo, TGF- $\beta$  a través de Smad2 inhibe la activación de STAT 1 y 3 que induce la acción de IL-6 sobre la vía JAK/STAT<sup>303</sup>. Contrariamente, se ha observado en ratones que, a nivel gástrico, IL-6 puede inducir mediante STAT3 la producción de Smad7 que ejerce un efecto inhibitor sobre la acción de TGF- $\beta$ <sup>304</sup>.

En la búsqueda de tratamientos eficaces sobre las enfermedades inflamatorias y no inflamatorias en la que participa la vía JAK/STAT, se han identificado diversas sustancias inhibitoras de dicha vía, como Tofacitinib, Oclacitinib, Ruxolitinib, Filgotinib, Decernotinib, Peficitinib o Baricitinib entre los más importantes<sup>295</sup>. Baricitinib es un inhibidor competitivo de la JAK quinasa que inhibe selectivamente, de manera efectiva y reversible JAK1 y JAK2, con IC50 de 5.9 y 5,7 nmol / L, respectivamente<sup>305</sup>. Su peso molecular es 371.42 Da y la fórmula molecular es C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S con un nombre químico 2- [1-etilsulfonil-3- [4-(7H-pirrólo [2,3-d] pirimidin-4-il) pirazol-1-il] acetidin-3-il] acetoniitrilo. Ha demostrado beneficios clínicos para los pacientes con AR, incluida la reducción

de la incidencia de daño articular estructural<sup>306-309</sup>. En ensayos basados en células de células T humanas, este fármaco inhibió la fosforilación de STAT3 y la producción posterior de MCP-1, así como la fosforilación de STAT3 inducida por IL-23 y la posterior producción de IL-17 e IL-22<sup>310</sup>. Presenta un perfil de seguridad similar a otros inhibidores como el tofacitinib. Las infecciones más comunes relacionadas con el uso de Baricitinib son las que ocurren en la parte superior del tracto respiratorio, bronquitis e infecciones del tracto urinario<sup>284</sup>.



## **Hipótesis de Trabajo**

## **6. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

A pesar de que la estenosis traqueal benigna de origen inflamatorio tiene diversas opciones terapéuticas, ninguna de ellas está exenta de complicaciones, en ocasiones graves o bien presentan una significativa tasa de recidivas convirtiéndose en terapias recurrentes de mantenimiento. La cirugía puede ser curativa pero es una técnica invasiva, que requiere alto nivel de experiencia para asegurar un resultado óptimo y con posibilidad de complicaciones no desdeñables.

El TGF- $\beta$  se ha demostrado como uno de los componentes fundamentales en la actividad reparativa de la cicatrización con actividad fibrosante bien descrita en la literatura, por lo que podría tener una actividad relevante en el desarrollo de la estenosis traqueal de origen inflamatorio. La vía JAK/STAT es otra vía intracelular de regulación de la expresión génica activada por diversos ligandos a los receptores celulares JAK con un conocido papel en la actividad regulador de la respuesta inflamatoria.

Partiendo de estas premisas, se plantea la hipótesis de si la inhibición de la vía de activación de TGF- $\beta$  podría reducir el grado de estenosis cicatricial de la estenosis traqueal inflamatoria mejorando el calibre y la luz de la estenosis. Así mismo, se plantea si la inhibición de la vía JAK/STAT podría tener su papel en el tratamiento de la estenosis traqueal de origen inflamatorio.

## **Objetivos**

## 7. OBJETIVOS

Los objetivos fundamentales de esta tesis son:

- Confirmar el papel relevante del TGF- $\beta$  en el proceso patológico de estenosis cicatricial inflamatoria de la vía aérea, en muestras humanas y de origen experimental.
- Validar un modelo de estenosis traqueal inflamatoria en animal de experimentación.
- Evaluar la capacidad de P17, un inhibidor del TGF- $\beta$  en el tratamiento de la estenosis traqueal de origen inflamatorio en un modelo experimental.
- Confirmar el papel relevante de la vía JAK/STAT en el proceso patológico de estenosis cicatricial inflamatoria de la vía aérea, en muestras humanas y de origen experimental.
- Evaluar la capacidad de Baricitinib, un inhibidor de la vía JAK/STAT en el tratamiento de la estenosis traqueal de origen inflamatorio en un modelo experimental.

## **Diseño del estudio. Material y Métodos**

## **8. DISEÑO DEL ESTUDIO. MATERIAL Y METODOS**

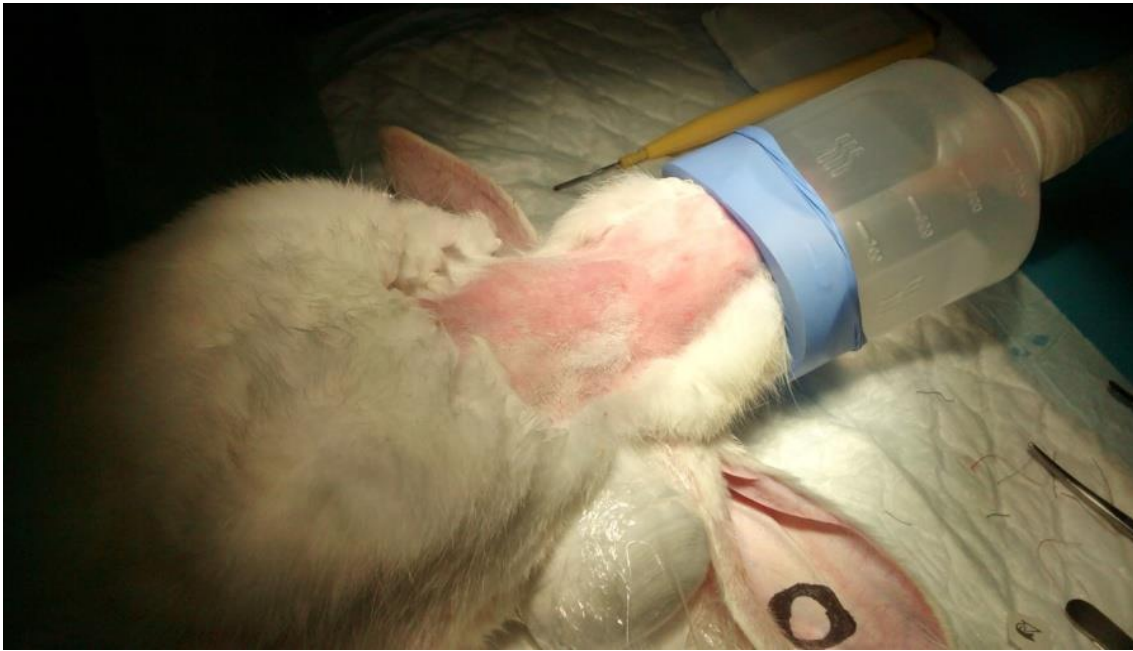
### **8.1. DECLARACIÓN ÉTICA**

Todos los procedimientos realizados en muestras humanas y en animales fueron respectivamente aprobados por el Comité de Investigación Clínica y el Comité de Uso y Cuidado de Animales del Hospital 12 de Octubre y se llevaron a cabo bajo las directrices institucionales.

### **8.2. MODELO ANIMAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL**

En una fase previa se propuso desarrollar un modelo de estenosis traqueal inflamatoria en conejos machos albinos adultos neozelandeses. (Granja cunícola San Bernardo, Navarra, España).

La técnica quirúrgica se realizó en los quirófanos del Centro de Investigación del Hospital 12 de Octubre cumpliendo con la asepsia adecuada. Los animales se sedaron mediante una inyección intramuscular (im) de 40 mg/Kg de Ketamina y 4 mg/kg de Acepromacina y se mantuvo con isoflurano al 1-4% por vía inhalatoria. Se posicionaron en decúbito supino en la mesa quirúrgica (Figura 4) y se fijaron las patas para que quedasen fuera del campo. Se rasuró la zona de incisión mediante maquinilla eléctrica, y se monitorizaron mediante pulsioximetría en la oreja para saturación de oxígeno periférica y frecuencia cardiaca. Tras la preparación de un campo quirúrgico estéril cervical, se procedió a la realización de una cervicotomía vertical y disección de musculatura cervical pretraqueal hasta la adecuada exposición de la tráquea, tal y como se muestra en la figura 5.



**Figura 4.** Posición del espécimen.



**Figura 5.** Cervicotomía y acceso a la tráquea cervical del espécimen.

Se realizó una incisión transversal entre dos anillos, aproximadamente entre el 5º y el 6º, con bisturí frío, y sin llegar a la sección completa de la tráquea preservando la pars membranosa. A continuación, se efectuó una lesión térmica con bisturí eléctrico con intensidad constante a 3.5 watios en modo coagulación de forma radial de 360º en la mucosa, con una extensión de dos anillos, tanto proximal como distal al punto de abordaje (Figura 6).

Se procedió al cierre de la incisión traqueal mediante puntos sueltos con sutura reabsorbible de poliglactina 5/0, así como al cierre por planos de la capa muscular pretraqueal y subcutánea, finalizando con grapas para la piel (Figura 7). En el postoperatorio se proporcionó analgesia con buprenorfina subcutánea a 25 mg/Kg.

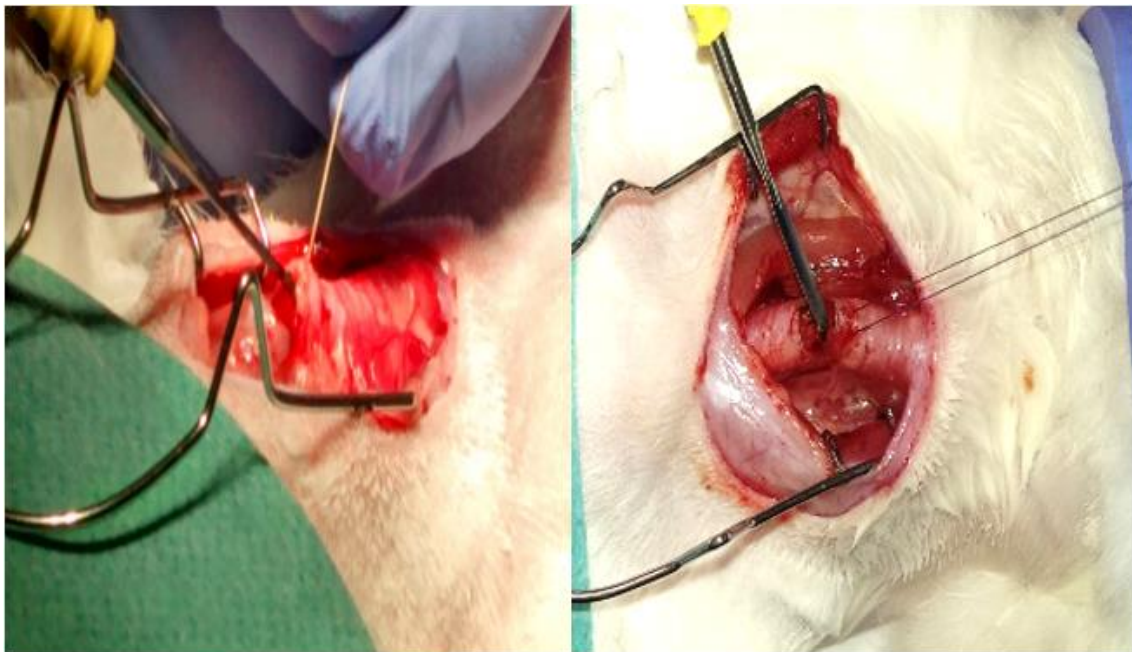
Transcurridas 4 semanas, los animales fueron sacrificados con una solución de tiopental sódico en inyección intravenosa (iv) a una dosis de 30mg/kg. Se realizó la extracción del bloque traqueal completo mediante reapertura de la incisión. Los tejidos se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% (Krape, Madrid, España) para su posterior inclusión en parafina.

Sobre este modelo animal de estenosis traqueal se ha realizado el estudio de dos moléculas, p17 y Baricitinib, con el fin de evaluar su capacidad de inhibición de la acción del TGF- $\beta$ .





**Figura 6.** Incisión transversa de la tráquea y acceso a la luz traqueal. Tracción sobre un extremo con sutura para mejor exposición.



**Figura 7.** Realización de la lesión térmica circunferencial de la mucosa traqueal.

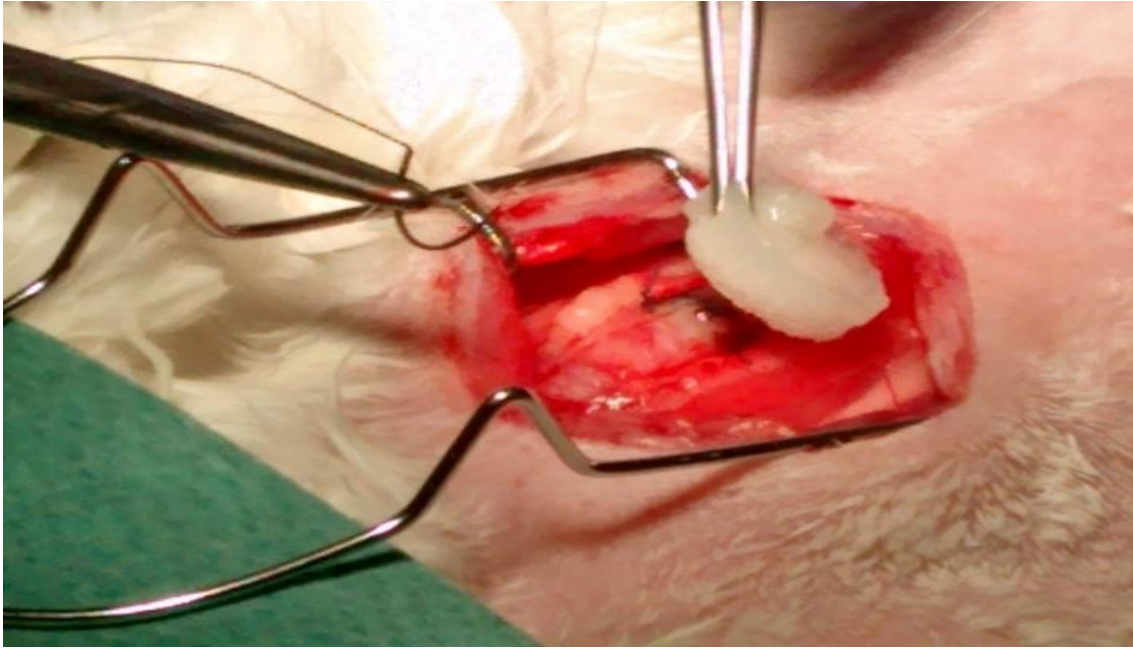
### 8.2.1. Efecto de p17 en el modelo de estenosis traqueal

NAFB002 o p17 (KRIWFIPRSSWYERA) es un péptido sintético con afinidad de unión a TGF- $\beta$ 1, identificado utilizando una librería de péptidos derivados de fagos (phage-displayed random 15-mer). La actividad de este péptido de 15 aminoácidos es dependiente de los primeros 11 aminoácidos y su capacidad como el mejor inhibidor de TGF- $\beta$ 1 ha sido probado con éxito *in vitro* así como en diferentes modelos animales<sup>311-317</sup>.

Para estudiar el papel de p17 en este modelo, se diseñó un estudio experimental de tipo casos y controles, tomándose una población de 40 conejos albinos neozelandeses adultos (Granja cunícola San Bernardo) de 3 meses de edad y de entre 3 y 4 Kg de peso a los que se les realizó el modelo de estenosis traqueal expuesto en el punto 8.2. Dicha población fue dividida en dos grupos de 20 animales, uno control y otro experimental, con las siguientes características:

- *Grupo control:* grupo de 20 conejos a los que se colocó alrededor de la sutura traqueal una esponja de lipogel con vehículo control (suero salino).
- *Grupo experimental:* grupo de 20 conejos a los que se colocó alrededor de la sutura traqueal una esponja de lipogel conteniendo 500  $\mu$ l del péptido p17, a una concentración de 2mg/ml.

Una vez realizado el cierre de la incisión traqueal con puntos sueltos con sutura reabsorbible, se colocó la esponja de lipogel, con o sin p17 sobre la sutura traqueal y se fijó a la misma mediante puntos sueltos con sutura reabsorbible de poliglactina (Figuras 8 y 9).



**Figura 8.** Colocación de la esponja de lipogel sobre la incisión traqueal tras cierre de la misma con puntos reabsorbibles.



**Figura 9.** Fijación de esponja de lipogel sobre la incisión traqueal con sutura reabsorbible.

### 8.2.2. Efecto de Baricitinib en el modelo de estenosis traqueal

El Baricitinib es un inhibidor selectivo y reversible de la Janus quinasa (JAK) 1 y 2. Las JAK fosforilan y activan transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT), lo que activa la expresión genética dentro de la célula. Baricitinib modula estas vías de señalización inhibiendo la actividad enzimática de JAK1 y JAK2, reduciendo de este modo la fosforilación y activación de STAT.

En esta fase del estudio, se planteó la realización de una experiencia inicial sobre el potencial efecto terapéutico de Baricitinib sobre el modelo animal de estenosis traqueal inflamatoria que en adelante podría servir como base para estudios posteriores relacionados con esta línea de investigación, para lo cual se diseñó un estudio experimental de tipo casos y controles a partir de una población de 12 conejos albinos neozelandeses adultos (Granja cunícola San Bernardo) de 3 meses de edad y de entre 3 y 4 Kg de peso a los que se les realizó el modelo de estenosis traqueal expuesto en el punto 8.2.

Se dividieron dos grupos de experimentación con 6 animales en cada uno con las siguientes características:

- *Grupo experimental:* grupo de 6 conejos a los que se administró un tratamiento con baricitinib por vía oral a dosis de 20mg/día en 2 ml de metilcelulosa 0,5%.
- *Grupo control:* grupo de 6 conejos a los que se administró 2 ml de metilcelulosa 0,5%.

El tratamiento se inició al tercer día tras la realización del modelo de estenosis traqueal y se administró a ambos grupos durante 14 días. Finalizado el tratamiento, tras otros 14 días (duración total del ensayo 28 días), se procedió al sacrificio del animal y a la extracción del bloque traqueal de forma similar a lo expuesto previamente.

### **8.3. PACIENTES**

Las muestras de tejidos traqueobronquiales humanos fueron obtenidas por escisión de lesiones estenóticas durante intervención terapéutica electiva de 7 pacientes pediátricos o adultos jóvenes con estenosis traqueal inflamatoria benigna de origen adquirido (67% varones, con edad media de  $20 \pm 7$  años [11–28 años de edad]). Como controles sanos, se obtuvieron 9 muestras humanas de resección de vía aérea por patología no estenótica inflamatoria (78% varones, media de edad de  $63 \pm 4$  años [58–70 años de edad]).

### **8.4. METODOS HISTOLÓGICOS**

#### **8.4.1. Tinciones histológicas**

Se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos (IHC) de los tejidos de pacientes con estenosis traqueal y controles sanos, así como de los tejidos animales incluidos en parafina. Las tráqueas procedentes del modelo animal fueron talladas y fotografiadas para calcular el área de luz traqueal.



#### **8.4.1.1. Evaluación histológica del contenido de colágeno traqueal**

Las muestras traqueales se tiñeron mediante el método tricrómico de Masson (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) para evaluar su contenido en colágeno. Las muestras se desparafinaron calentándolas a 60°C en un termo-bloque (Techne, Cambridge, Reino Unido), se sumergieron en xileno (Merck, Barcelona, España) 10 minutos y posteriormente se rehidrataron con alcoholes (Merck) seriados (100%, 96%, 70%) durante 2 minutos cada uno. Se post-fijaron con solución Bouin durante 15 minutos a 56°C y se lavaron abundantemente con agua. A continuación se tiñeron con hematoxilina (Vector Laboratories, CA, EEUU) durante 20 minutos y se lavaron con agua hasta retirar el exceso.

Posteriormente se incubaron durante 3 minutos en solución Scotts (dilución 1/10) continuando con la solución Biebrich Scarlet durante 1 minuto y lavando extensamente con agua destilada. Tras ello, las preparaciones se sumergieron durante 20 minutos en una solución al mismo porcentaje en volumen (v/v) de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico y seguidamente en anilina el mismo tiempo. Se lavaron rápidamente con agua desionizada y se dejaron en ácido acético (Sigma-Aldrich) al 1% durante 1 minuto. A continuación, las muestras se deshidrataron en alcoholes seriados durante 1 minuto cada uno y xilenos durante 10 minutos. Por último se montaron con el medio de montaje Entellan (Merck).

La cuantificación del área de colágeno se realizó analizando el porcentaje de área de color azul obtenido tras la tinción con anilina en imágenes digitalizadas realizadas con un aumento de 100x.

#### **8.4.1.2. Evaluación histológica de la estructura del cartílago traqueal**

Las tinciones con safranina O para tinción de cartílago traqueal, se realizaron sobre tejido parafinado procedente de los ensayos en el modelo animal. Los tejidos se desparafinaron como se citó anteriormente, y se hidrataron con agua destilada. A continuación, se tiñeron con la solución de hematoxilina Weigert's iron hematoxylin (hematoxilina al 1% en alcohol al 95% (Sigma-Aldrich): cloruro férrico al 29% en agua con un contenido de ácido clorhídrico del 1%) durante 10 segundos y se lavaron abundantemente con agua. Seguidamente, las muestras se tiñeron con la solución Fast green (FCF) al 0,01% (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos y se lavaron rápidamente con ácido acético al 1% durante 15 segundos. Posteriormente, los tejidos se contratiñeron con la solución de safranina O al 0,1% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos y se deshidrataron las muestras con alcohol y xileno durante 2 minutos cada uno. Por último, las muestras se montaron con el medio de montaje Entellan (Merck) y se visualizaron al microscopio. Como resultado de esta tinción, los núcleos se tiñeron de negro, mientras que el cartílago se visualizó en rojo, debido a la safranina.

#### **8.4.2. Inmunodetección**

Para la cuantificar la expresión de las moléculas p-Smad 2/3,  $\alpha$ -SMA, CTGF y p-STAT3 y se realizó un estudio inmunohistoquímico de dichas moléculas sobre las muestras traqueales.

Los tejidos incluidos en parafina se cortaron en un microtomo a 4 $\mu$ m y se montaron en portaobjetos silanizados (Dako, CA, EEUU). Se desparafinaron y se rehidrataron como se explicó en el apartado 8.4.1.1. Las muestras se

calentaron en microondas para la recuperación de epítomos en un tampón EDTA 1mM pH8 (Sigma-Aldrich, MO, EEUU) durante 20 minutos. Una vez atemperadas, las muestras se lavaron con tampón fosfato-salino (PBS; Invitrogen, Piesley, Reino Unido). Realizados los pasos anteriores se detectaron los antígenos que eran objeto de nuestro estudio mediante anticuerpos específicos. La detección de los anticuerpos se llevó a cabo mediante inmunoperoxidasa.

#### **8.4.2.1. Inmunoperoxidasa**

La detección de los anticuerpos por inmunoperoxidasa se realizó siguiendo el método indirecto de avidina-biotina-peroxidasa ABC (Vector Laboratories). En los tejidos lavados con PBS, la peroxidasa endógena se bloqueó sumergiendo las preparaciones en metanol (Lab-scan, Sowinskiogo, Polonia) al 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos en oscuridad. Después se bloquearon los tejidos con suero (de la misma especie animal del anticuerpo secundario) al 1,5% (en PBS) durante 30 minutos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario adecuado (Tabla 2) toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.

Se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado apropiado (Tabla 3) durante 20 minutos. Se prepararon los complejos avidina-biotina según el protocolo del producto y con ellos se incubaron las secciones durante 30 minutos. Las muestras se revelaron con diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Por último se realizó una tinción con hematoxilina y tras la



deshidratación de los tejidos con alcoholes seriados y xilenos se montaron con medio Entellan (Merck). Se incluyeron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario y se incubaron con los sueros no inmunes adecuados.

<b>Antígeno</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
$\alpha$ -SMA	Ratón anti-humano	1:200	Sigma-Aldrich Química, Madrid, España
CTGF	Cabra anti-ratón	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, EEUU
pSmad 2/3	Conejo anti-humano	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, EEUU
p-STAT3	Ratón anti-humano	1:100	Cell Signaling Technology, MA, EEUU

**Tabla 2:** Anticuerpos primarios.

<b>Isotipo</b>	<b>Anticuerpo reconocido</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
Caballo anti- ratón IgG	$\alpha$ -SMA	1:200	Vector Laboratories, CA, EEUU
Caballo anti- cabra IgG	CTGF	1:200	Vector Laboratories, CA, EEUU
Cabra anti- conejo IgG	pSmad 2/3	1:200	Jackson ImmunoResearch, MD, EEUU
Polímero anti- ratón (Kit Envision)	p-STAT3	-	Dako, CA, EEUU

**Tabla 3:** Anticuerpos secundarios.

## **8.5. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DATOS IHC**

Las secciones de tráquea se visualizaron en un microscopio Zeiss Scope A1 (Zeiss, Jena, Alemania), fotografiado y digitalizado utilizando una cámara AxioCam ERc 5S y el software ZEN Lite 2012. Para cuantificar el engrosamiento traqueal, el área de colágeno o la densidad celular (células  $\alpha$ -SMA, pSmad2/3 y CTGF positivas), así como calcular el área de luz traqueal, se utilizó el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## **8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el estudio estadístico se utilizó el software Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ ES. Los datos cuantitativos fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney y el análisis de correlación mediante el test de Spearman. Los valores  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## **Resultados**

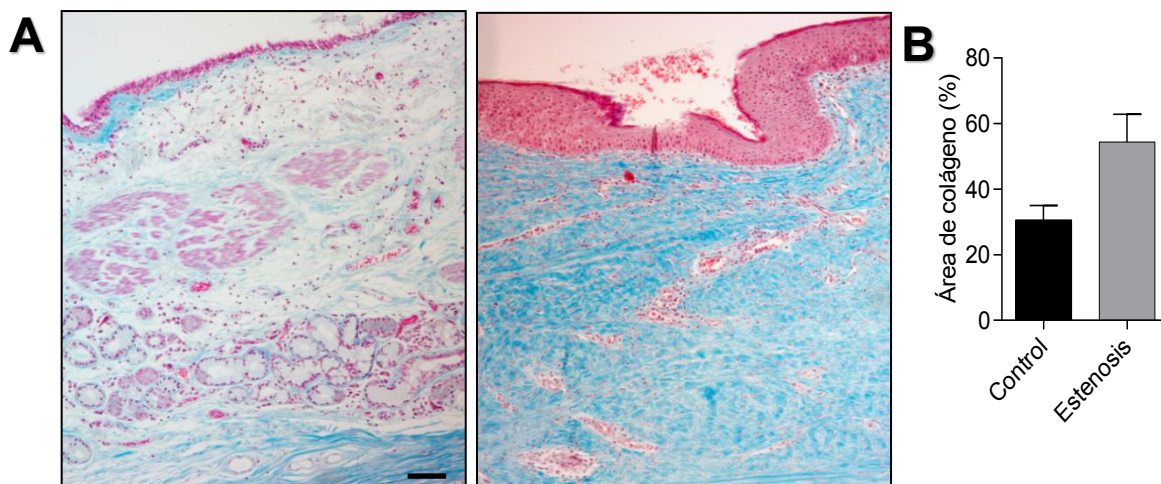
## 9. RESULTADOS

### 9.1. ESTUDIO DEL TEJIDO TRAQUEOBRONQUIAL DE PACIENTES CON ESTENOSIS TRAQUEAL

Las muestras procedentes de resecciones quirúrgicas de pacientes con estenosis traqueal inflamatoria (n=7) así como las muestras obtenidas de los controles sanos (n=9) se estudiaron a fin de determinar los posibles cambios histopatológicos relacionados con la activación de TGF- $\beta$  en la estenosis traqueal.

Para determinar el contenido de colágeno de las muestras, como primer marcador de la acción de TGF- $\beta$  cuya acción sobre los fibroblastos induce el aumento de producción de matriz extracelular, se tiñeron las muestras obtenidas mediante la tinción Tricrómica de Masson, que confiere una coloración azul al colágeno por la acción de la anilina.

En la figura 10 se recogen dos secciones representativas de muestras humanas sanas y de estenosis traqueal, teñidas mediante el tricrómico de Masson. En la fotografía de estenosis traqueal se observa el aumento no significativo ( $p=0.08$ ) de grosor de la capa submucosa subyacente al epitelio con color rosado a expensas de un aumento de colágeno teñido en azul. Este hallazgo se pone de manifiesto en el análisis estadístico comparativo del porcentaje de área de colágeno donde se observa un aumento del porcentaje del área de presencia de fibras de colágeno submucoso en las muestras de estenosis traqueal en comparación con los controles sanos.

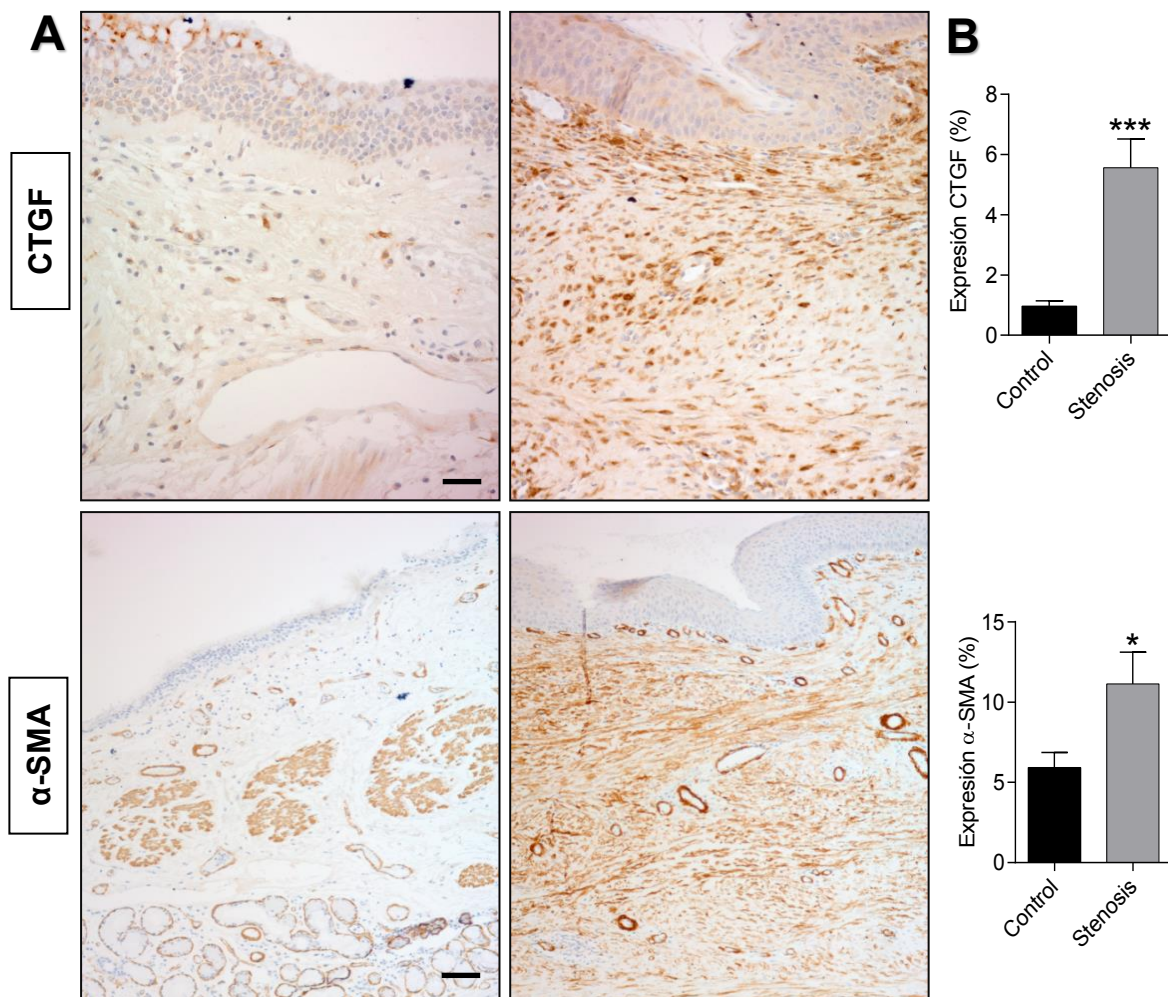


**Figura 10.** (A) Tinción tricrómica de Masson de secciones traqueales humanas sana (izquierda) y con estenosis traqueal inflamatoria (derecha). Barra 100 $\mu$ m. (B) Análisis cuantitativo del área de colágeno.

También se ha estudiado mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de varias moléculas intracelulares consideradas marcadores secundarios de la acción y activación del TGF- $\beta$  en tejido humano de estenosis traqueal. Tal y como se comentó en la introducción, la presencia de  $\alpha$ -SMA supone la activación de fibroblastos a miofibroblastos inducida por TGF- $\beta$ . Los miofibroblastos activados, a su vez inducidos por TGF- $\beta$  aumentan la producción de matriz extracelular implicada en los procesos fibrosantes y de cicatrización.

La figura 11 muestra dos secciones representativas de muestras humanas sanas (izquierda) y de estenosis traqueal (derecha), en las que se ha realizado una tinción inmunohistoquímica para la determinación de CTGF y  $\alpha$ -SMA. En las muestras para detección de CTGF se observa un incremento significativo de la expresión de CTGF generalizada a nivel de la submucosa en las muestras procedentes de pacientes con estenosis traqueal respecto a los controles sanos que muestran una escasa expresión. En las muestras para detección de  $\alpha$ -SMA

se observa una positividad débil circunscrita únicamente a las fibras musculares en los controles sanos mientras que en la muestra de estenosis traqueal se observa una positividad generalizada en la práctica totalidad de la capa submucosa.



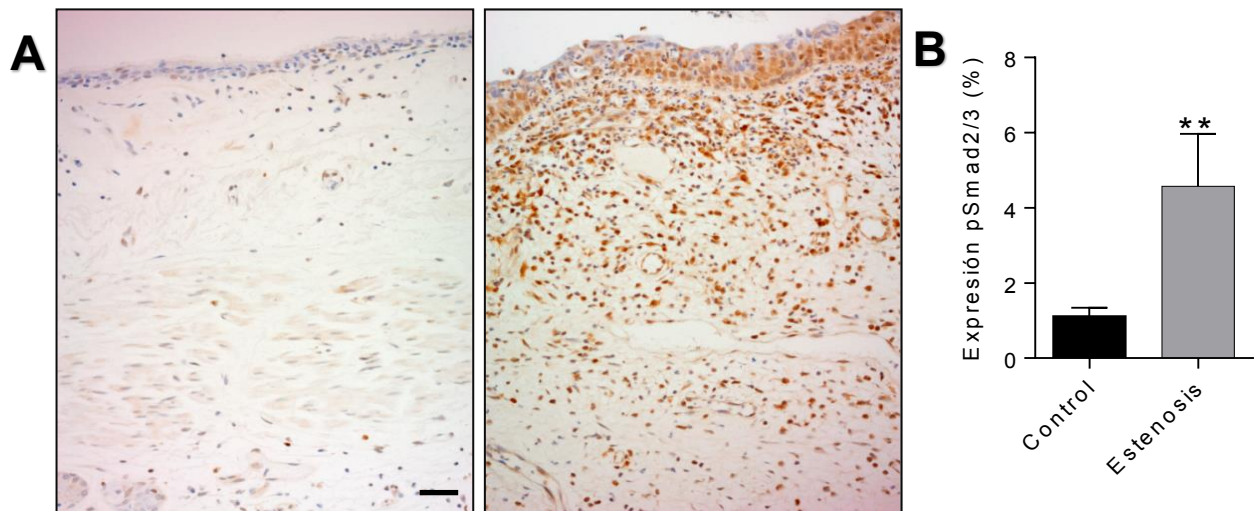
**Figura 11.** Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo de la expresión de CTGF y α-SMA en secciones traqueales humanas. (A) Muestra de secciones traqueales humanas sana (izquierda) y con estenosis traqueal (derecha). Barra α-SMA 100 μm; Barra CTGF 50μm. (B) Análisis cuantitativo de la expresión de CTGF (\*\* $p < 0.001$ ) y α-SMA (\* $p < 0.05$ ).

Todos estos cambios histológicos se analizaron de forma cuantitativa confirmándose un aumento en la expresión de  $\alpha$ -SMA y CTGF en las muestras de estenosis traqueal en comparación con los controles sanos con diferencias estadísticamente significativas en ambos casos ( $p=0.0002$  y  $p=0.022$ , respectivamente).

Por último, se analizó la presencia del factor nuclear pSmad2/3, como proteína intracelular implicada en la cascada de activación de TGF- $\beta$  y marcador directo de su acción intracelular. Tal y como se comentó en la introducción, las proteínas Smad son una familia de proteínas implicadas en la transducción de la señal intracelular de TGF- $\beta$ , de tal manera que son fosforiladas (p-Smad) y por tanto activadas por el receptor de TGF- $\beta$  tras la unión de TGF- $\beta$  al receptor.

La figura 12 muestra dos secciones representativas de muestras humanas sanas (izquierda) y de estenosis traqueal (derecha) sometidas a técnicas inmunohistoquímicas para la determinación de p-Smad 2/3 como marcador intracelular de la activación del TGF- $\beta$ , dotando de una coloración marronácea a la muestra en caso de positividad. En este estudio se observa un aumento de la expresión de p-Smad 2/3 en las muestras humanas con estenosis traqueal, tanto a nivel del epitelio traqueal como en las células de la submucosa, en comparación con las muestras humanas sanas control. El análisis cuantitativo de la expresión de p-Smad2/3, mostró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p=0.0075$ ).





**Figura 12.** Muestra de secciones traqueales humanas sana (izquierda) y con estenosis traqueal inflamatoria (derecha). (A) Tinción inmunohistoquímica para p-Smad2/3. Barra 50μm. (B) Análisis cuantitativo de pSmad2/3 (\*\* $p < 0.01$ ).

## 9.2. INDUCCIÓN DE ESTENOSIS TRAQUEAL EN UN MODELO ANIMAL

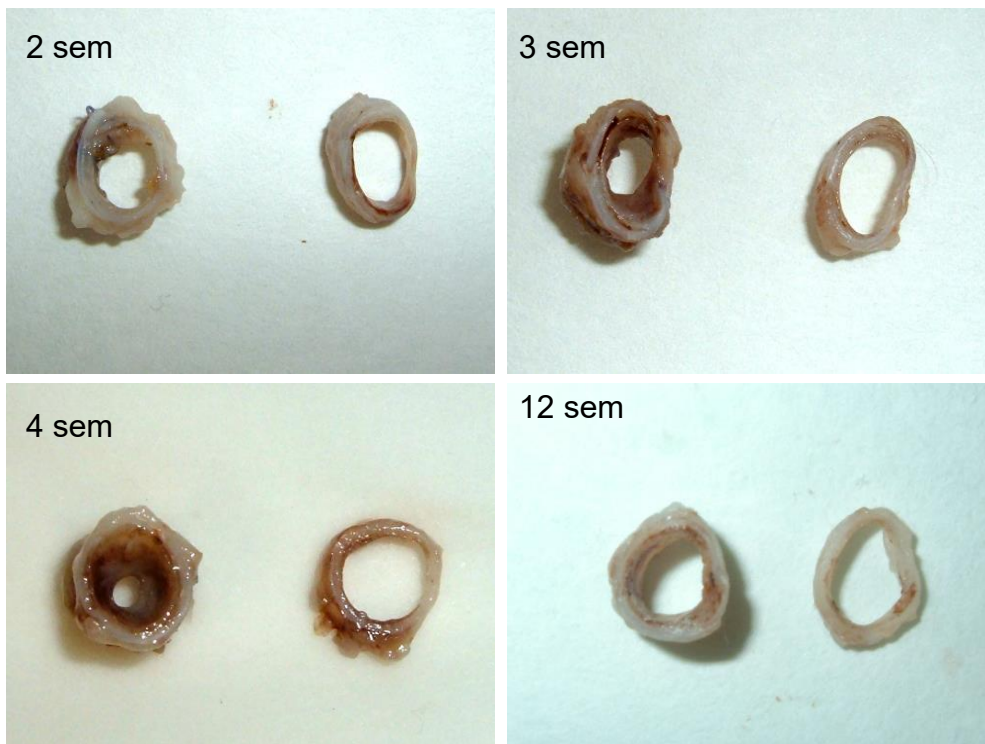
Una vez estudiados los cambios histológicos y moleculares potencialmente relacionados con la acción de TGF- $\beta$  en la estenosis traqueal humana se ha propuesto el objetivo de desarrollar un modelo animal que reprodujera estos cambios. Para ello se diseñó el modelo de estenosis traqueal en animal de experimentación descrito en el punto 8.2 (“Modelo animal de estenosis traqueal”) y se estudiaron los cambios histológicos y moleculares producidos en las muestras traqueales del animal de experimentación.

### **9.2.1. Análisis de la luz traqueal en el modelo animal de estenosis traqueal**

Se realizó un análisis de la luz traqueal existente en las secciones traqueales procedentes del animal de experimentación. Los animales fueron sometidos al procedimiento descrito en el punto 8.2 “Modelo animal de estenosis traqueal” y fueron sacrificados a las 4 semanas para la extracción y estudio del bloque traqueal.

Para determinar el tiempo necesario para el desarrollo de la estenosis traqueal máxima sin conllevar el fallecimiento del animal de experimentación se realizaron previamente estudios de secciones traqueales a las 2, 3 y 4 semanas tras la realización de la intervención quirúrgica inductora de la estenosis. En la figura 13 se observan fotografías comparativas de las secciones traqueales macroscópicas de animal de experimentación realizadas semanalmente. A la izquierda se sitúan los anillos con estenosis traqueal y a la derecha anillos sanos de control.

En las muestras traqueales de animal de experimentación sometidas al modelo de estenosis se observó una reducción progresiva de la luz traqueal asociado a un engrosamiento de la pared de la misma, desde la 2ª semana hasta la 4ª semana donde se observó el grado máximo de estenosis sin llegar a estenosis crítica que conllevara el fallecimiento del animal previo a su sacrificio. Se realizó un estudio a largo plazo obteniéndose una imagen obtenida a las 12 semanas donde se objetivó una reducción casi completa del engrosamiento submucoso de manera espontánea.



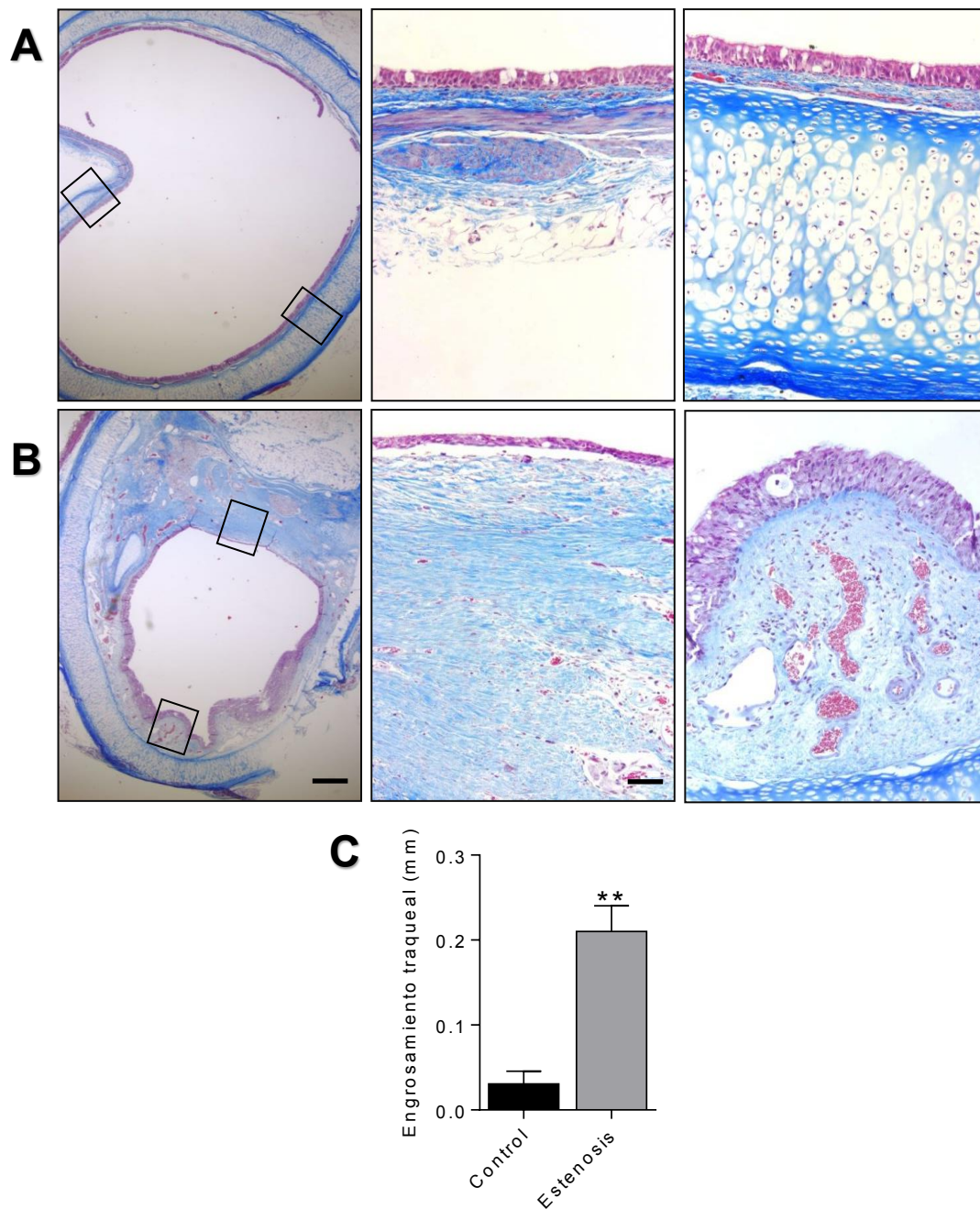
**Figura 13.** Sección trasversal de tráquea comparativamente entre los controles y los casos del modelo animal de estenosis traqueal mediante lesión térmica de la mucosa.

### 9.2.2. Análisis histopatológico del tejido traqueal en el modelo animal de estenosis traqueal

Las muestras procedentes de animal de experimentación se sometieron a la tinción tricrómica de Masson de igual manera que las muestras humanas, con el fin de determinar la expresión de colágeno existente en dichas muestras.

El estudio reveló un aumento significativo de la respuesta fibrótica en la submucosa en las secciones traqueales procedentes de los animales de experimentación sometidos al modelo de estenosis con un aumento de depósito de colágeno teñido de azul mediante la tinción tricrómica de Masson. Además, se observó una hiperplasia del epitelio traqueal y la presencia de un abundante

infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por células mononucleares y mastocitos. Este hallazgo se representa en la figura 14. En el análisis estadístico comparativo del engrosamiento traqueal de las muestras de estenosis con los controles sanos se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.007$ ).



**Figura 14.** Muestras representativas de secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal, teñidas con tinción Tricrómica de Masson a x25 aumentos y zonas detalladas a x200 aumentos. (A) Secciones sanas control. (B) Secciones procedente de zona de estenosis. Barra 400 $\mu$ m y detalles 50 $\mu$ m. (C) Análisis cuantitativo del engrosamiento traqueal secundario a colágeno (\*\* $p < 0.01$ ).

### **9.2.3. Determinación IHC de la expresión de $\alpha$ -SMA y CTGF en el tejido traqueal**

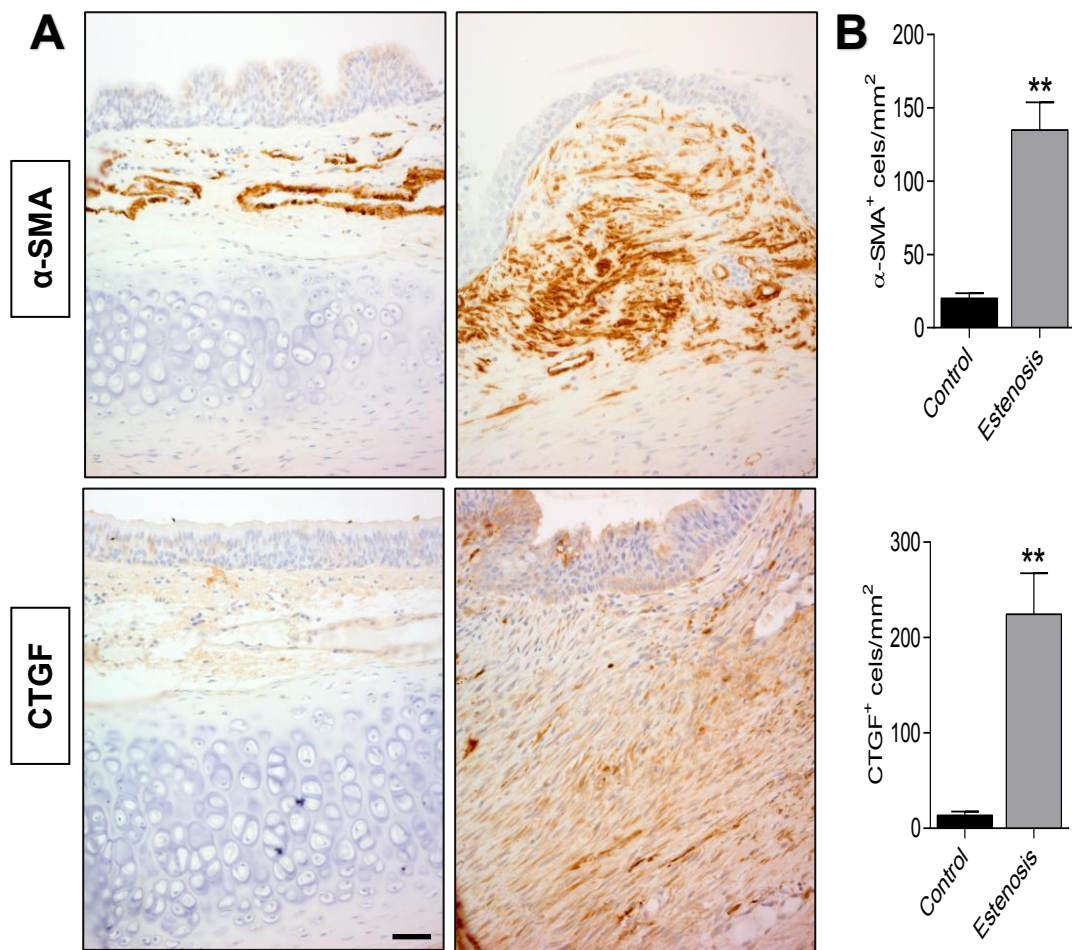
Para la realización del estudio de los marcadores de actividad de TGF- $\beta$  a nivel molecular, se sometió a las muestras traqueales del modelo animal de estenosis traqueal a un análisis inmunohistoquímico de  $\alpha$ -SMA y CTGF, similar al realizado en el análisis de las muestras humanas.

En la figura 15 se muestran las secciones traqueales animales previamente obtenidas, teñidas mediante IHC para la detección de CTGF y  $\alpha$ -SMA, a la derecha las muestras de animales con estenosis traqueal y a la izquierda los controles animales sanos.

En el estudio de  $\alpha$ -SMA se observa una fuerte expresión de  $\alpha$ -SMA teñida en marrón en la práctica totalidad del área submucosa mientras que en la muestra control se observa expresión únicamente alrededor de estructuras vasculares, con presencia de células musculares que contienen actina.

En el estudio de CTGF se observa también una positividad en la mayoría de la capa submucosa de las muestras de animal con estenosis traqueal, ausente en el control sano. En el análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas en ambos estudios de  $\alpha$ -SMA y CTGF (\*\* $p < 0.01$  en ambos casos).





**Figura 15.** Muestra de secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal. (A) inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA y CTGF. Barra 50 $\mu$ m. (B) Análisis cuantitativo del número de células positivas para  $\alpha$ -SMA y CTGF por área.

### **9.3. ANÁLISIS DEL EFECTO DE P17 SOBRE MUESTRAS ANIMALES DEL MODELO DE ESTENOSIS TRAQUEAL.**

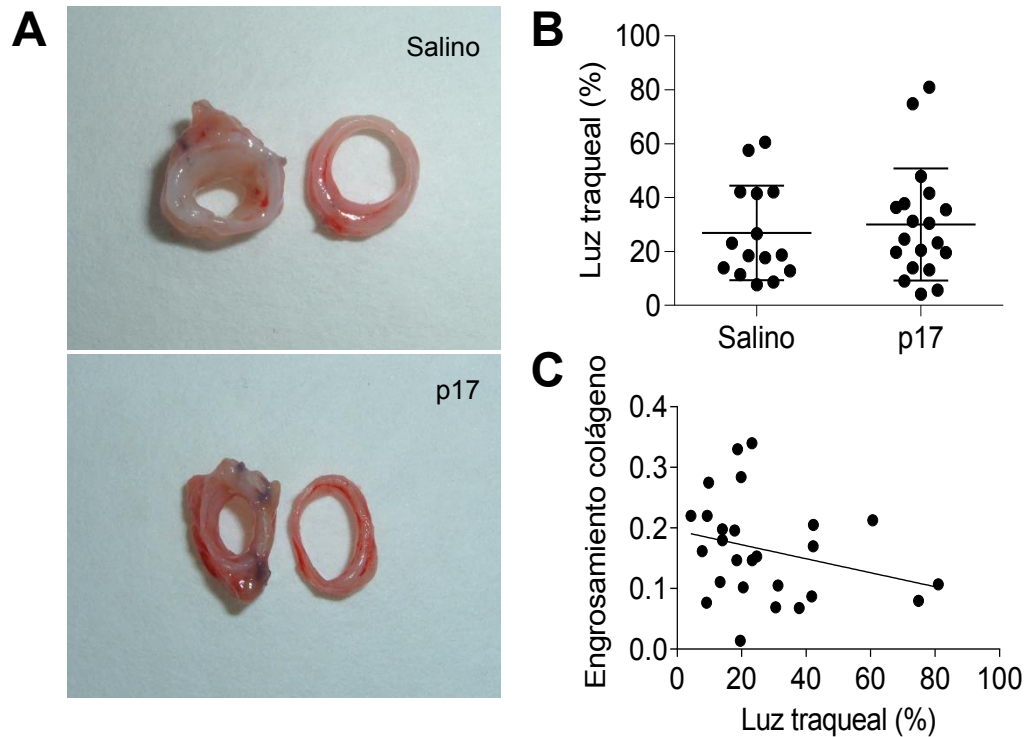
Tras el estudio de los cambios histológicos y moleculares en muestras traqueales humanas y del modelo animal de estenosis traqueal, se estudió el efecto de un inhibidor de TGF- $\beta$ , p17, sobre las muestras animales de estenosis traqueal. De los 40 animales sometidos al estudio (control n=20 y p17 n=20) se obtuvieron datos de 34 animales (control n=15 y p17 n=19), excluyéndose el resto por mortalidad precoz antes de la 3ª semana.

#### **9.3.1. Análisis de la luz traqueal**

Se realizó un estudio de la luz traqueal para lo cual se realizaron secciones horizontales de los bloques traqueales de los animales procedentes de ambos grupos. El análisis cuantitativo del porcentaje de luz traqueal no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 16).

Además se realizó un análisis de correlación entre el área luminal y el grosor submucosa colágena que se muestra en la figura 16 observándose una tendencia a una correlación negativa pero con un coeficiente bajo, no significativo ( $r=0.29$ ).



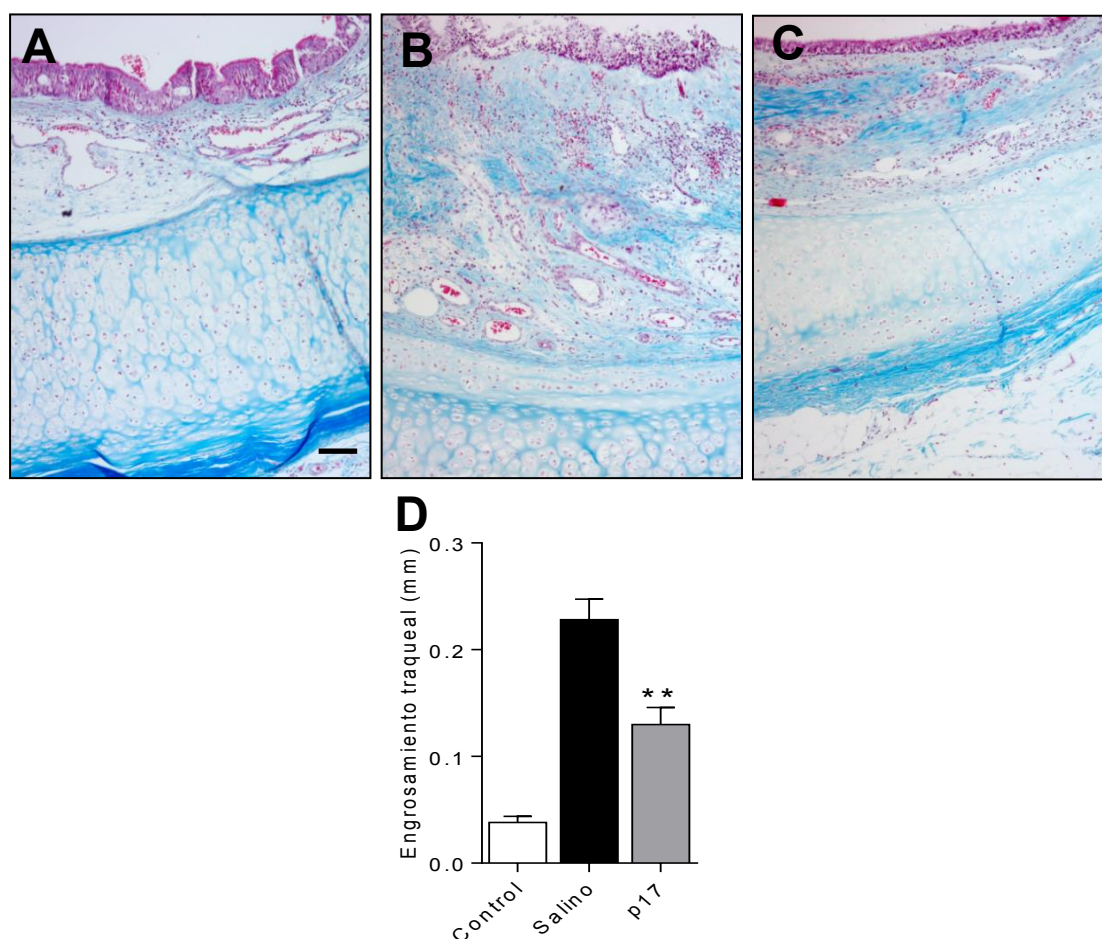


**Figura 16.** (A) Sección transversal de muestras traqueales de modelo animal de estenosis traqueal: comparativa entre especímenes que recibieron salino y p17. Anillo izquierdo con estenosis traqueal, anillo derecho sano control. (B) Análisis cuantitativo del porcentaje de luz traqueal. (C) Análisis de correlación entre espesor de colágeno submucoso y porcentaje de luz traqueal.

### 9.3.2. Análisis del colágeno submucoso

Para la cuantificación de la fibrosis, se realizó la medición del grosor máximo del área de colágeno en la submucosa tras someter a la tinción Tricrómica de Masson las muestras tratadas con p17 y las muestras que recibieron salino así como controles sanos. Los animales tratados con p17 presentaron un grosor medio de  $0,1779 \pm 0,1825$  mm mientras que aquellos animales control que recibieron salino mostraron un mayor grosor medio de  $0,2281 \pm 0,06649$  mm.

El grosor máximo del área de colágeno submucoso se redujo significativamente en el grupo de animales que fueron tratados con p17, tal y como se muestra en la figura 17, donde se muestra una disminución del grosor de la capa submucosa en aquellos animales que recibieron p17 respecto a los animales que recibieron salino que mantuvieron un engrosamiento submucoso significativo. Esta observación se confirma en el análisis estadístico que muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (\*\* $p < 0.01$ ).

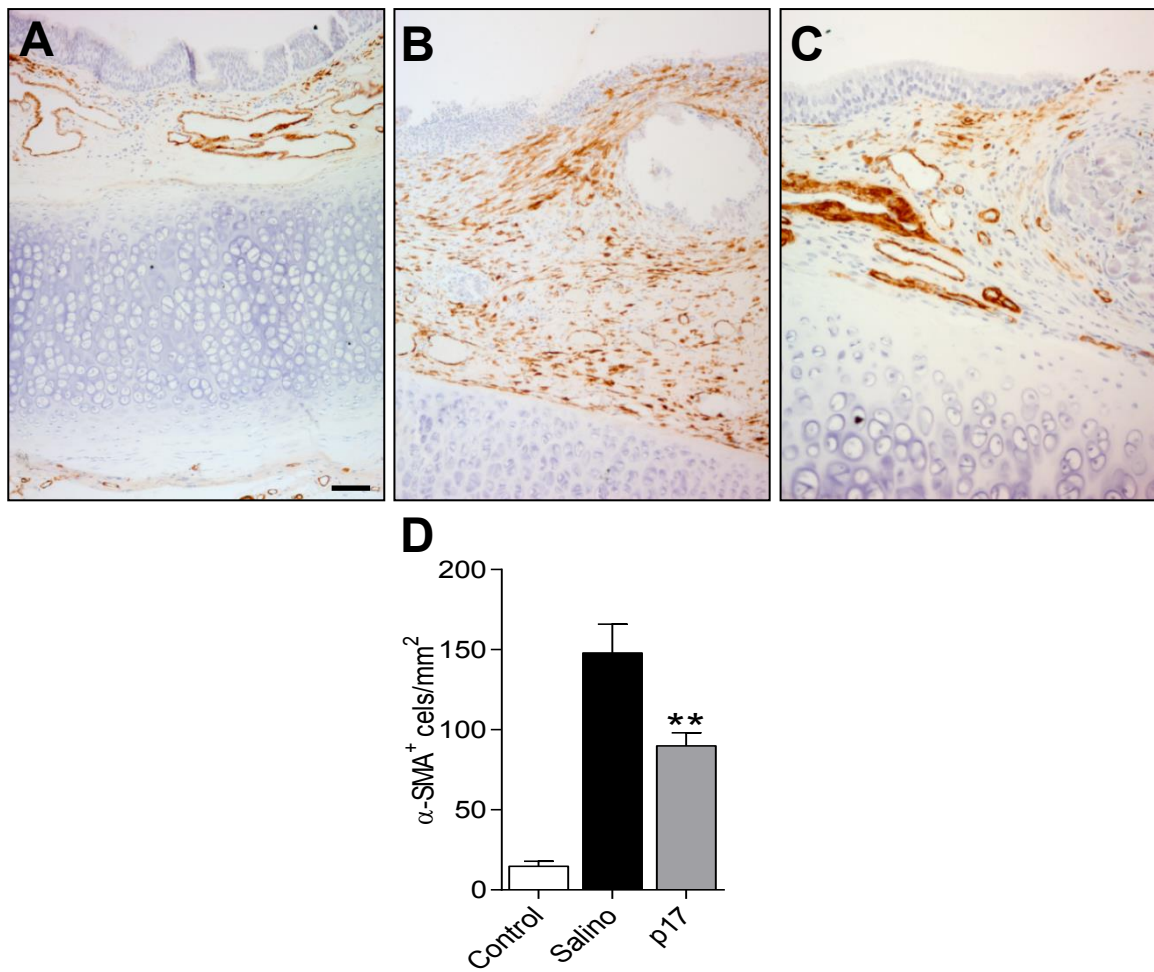


**Figura 17.** Muestras de sección traqueal de animal de experimentación teñidas con tinción Tricrómica de Masson. (A). Anillo sano control. (B) Estenosis traqueal tratada con salino. (C) Estenosis traqueal tratada con p17. Barra 100 $\mu$ m. (D) Análisis cuantitativo del engrosamiento traqueal

### 9.3.3. Análisis de la expresión de $\alpha$ -SMA

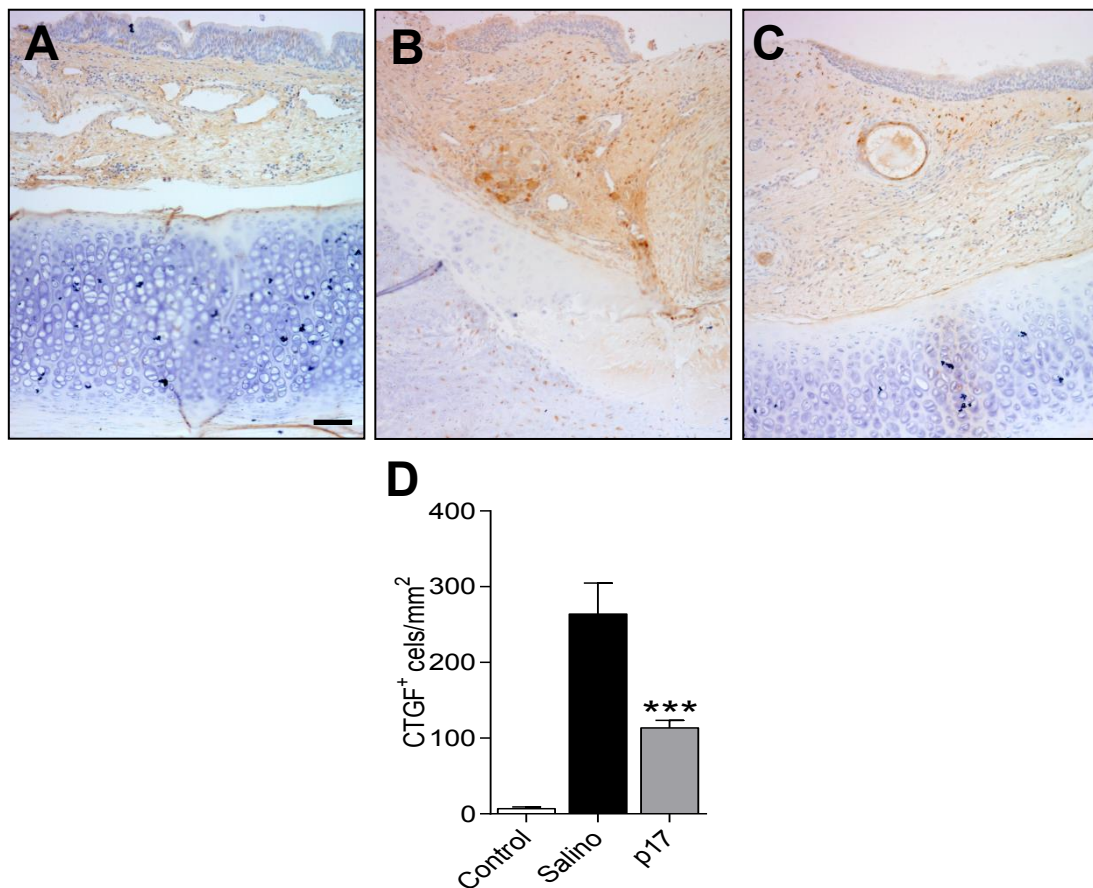
Para determinar la presencia de células  $\alpha$ -SMA positivas en las muestras traqueales de animal de experimentación tratado con p17 se sometió a las muestras a un análisis inmunohistoquímico para la detección de  $\alpha$ -SMA.

Las muestras de estenosis traqueal de animal de experimentación que recibieron suero salino tuvieron una media de  $147,9 \pm 57,02$  células  $\alpha$ -SMA positivas por  $\text{mm}^2$  mientras que aquellos animales que recibieron p17 obtuvieron una menor media de células  $\alpha$ -SMA positivas por  $\text{mm}^2$  ( $89,85 \pm 29,93$ ). La presencia de células positivas para  $\alpha$ -SMA se redujo por tanto en los animales que recibieron p17 en comparación con los que recibieron suero salino tal y como se muestra en la figura 18, donde se pone de manifiesto que en las muestras sanas y tratadas con p17 la presencia de células  $\alpha$ -SMA positivas, teñidas en color marrón, se circunscriben prácticamente a las estructuras vasculares como presencia del músculo liso vascular, mientras que en las muestras de estenosis traqueal tratada con suero salino se observa un aumento del grosor de la capa submucosa con amplia positividad difusa para  $\alpha$ -SMA. En el análisis cuantitativo de las células positivas para  $\alpha$ -SMA se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (\*\* $p < 0.01$ ).



**Figura 18.** Muestras de sección traqueal procedentes de animal de experimentación teñidas mediante IHC para  $\alpha$ -SMA. (A) Anillo traqueal sano control. (B) Sección de estenosis traqueal tratada con salino. (C) Sección traqueal tratada con p17. Barra 100 $\mu$ m. (D) Análisis cuantitativo de las células positivas para  $\alpha$ -SMA.

De igual manera, se realizó un análisis IHC para determinar la expresión de CTGF en las muestras del modelo de estenosis traqueal tratadas con p17 y salino. Los animales de experimentación que recibieron salino presentaron una media de 263,8 $\pm$ 123,3 células CTGF positivas por mm<sup>2</sup> mientras que los animales que recibieron p17 tuvieron una menor expresión de células CTGF positivas por mm<sup>2</sup> con una media de 113,4 $\pm$ 35,24, tal y como se puede observar en la figura 19, donde las muestras de estenosis traqueal que recibieron suero salino presentaron una expresión fuerte para CTGF, teñida en marrón, ampliamente distribuida por la capa submucosa mientras que en las muestras de estenosis traqueal tratada con p17 se observa una baja expresión de CTGF más semejante a las muestras traqueales sanas. En el análisis cuantitativo del número de células CTGF positivas por área se confirma una disminución estadísticamente significativa en los animales que recibieron p17 respecto a los que recibieron suero salino (\*\*p<0.001).



**Figura 19.** Muestras de sección traqueal procedentes de animal de experimentación teñidas mediante IHC para CTGF. (A) Anillo traqueal sano control. (B) Sección de estenosis traqueal tratada con salino. (C) Sección traqueal tratada con p17. Barra 100µm. (D) Análisis cuantitativo de las células CTGF positivas por área.

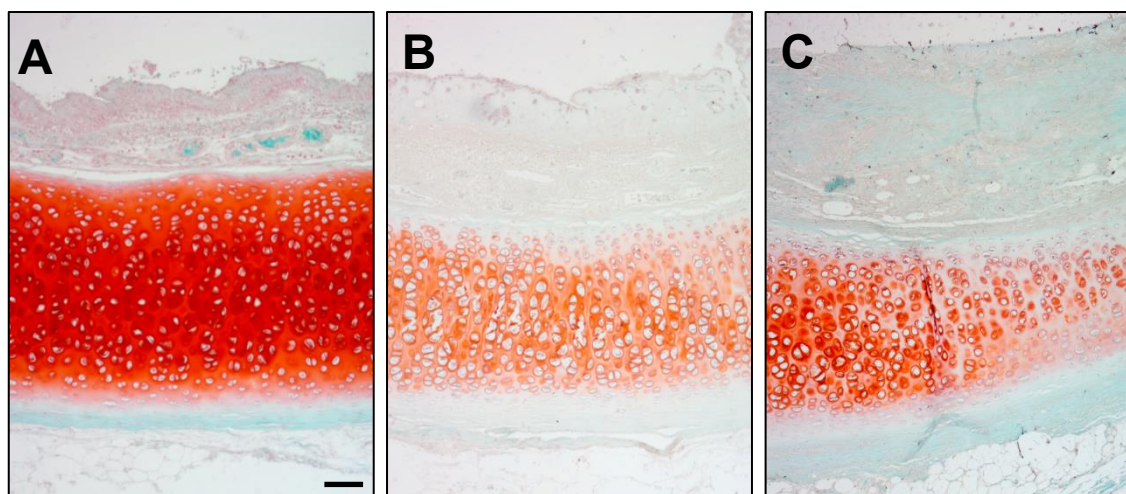
#### 9.3.4. Evaluación de la estructura del cartílago del tejido traqueal en el modelo animal

Para evaluar la integridad de la estructura del cartílago traqueal, se tiñeron con safranina las muestras de estenosis traqueal de animal de experimentación



y se realizó una comparativa entre los animales que recibieron p17 y los que recibieron salino y, a su vez con muestras traqueales sanas control.

En la figura 20 observamos muestras representativas de secciones traqueales de animal de experimentación teñidas con safranina que confiere al cartílago traqueal una coloración rojiza anaranjada. En la muestra de estenosis traqueal se observa la presencia de daños en el cartílago en forma de áreas irregulares de disminución de grosor y de densidad de cartílago con una tinción de proteoglicanos más débil. Estas áreas de reducción de grosor y proteoglicanos fueron similares en el grupo de estenosis traqueal que recibió salino y el que recibió p17



**Figura 20.** Secciones de estenosis traqueal de animal de experimentación teñidas con Safranina para evaluación del cartílago traqueal. (A) Control sano. (B) Estenosis traqueal tratada con salino. (C) Estenosis traqueal tratada con p17. Barra 100 $\mu$ m

#### **9.4. ESTUDIO DE LA VÍA JAK-STAT EN LA ESTENOSIS TRAQUEAL**

Tal y como se ha comentado en la introducción, la vía JAK STAT es una vía intracelular de regulación de la expresión génica que se activa por diversos ligandos a receptores celulares JAK y tiene un importante papel en la actividad regulador de la respuesta inflamatoria por lo que podría ser una potencial diana terapéutica para los procesos fibróticos, entre ellos la estenosis traqueal inflamatoria.

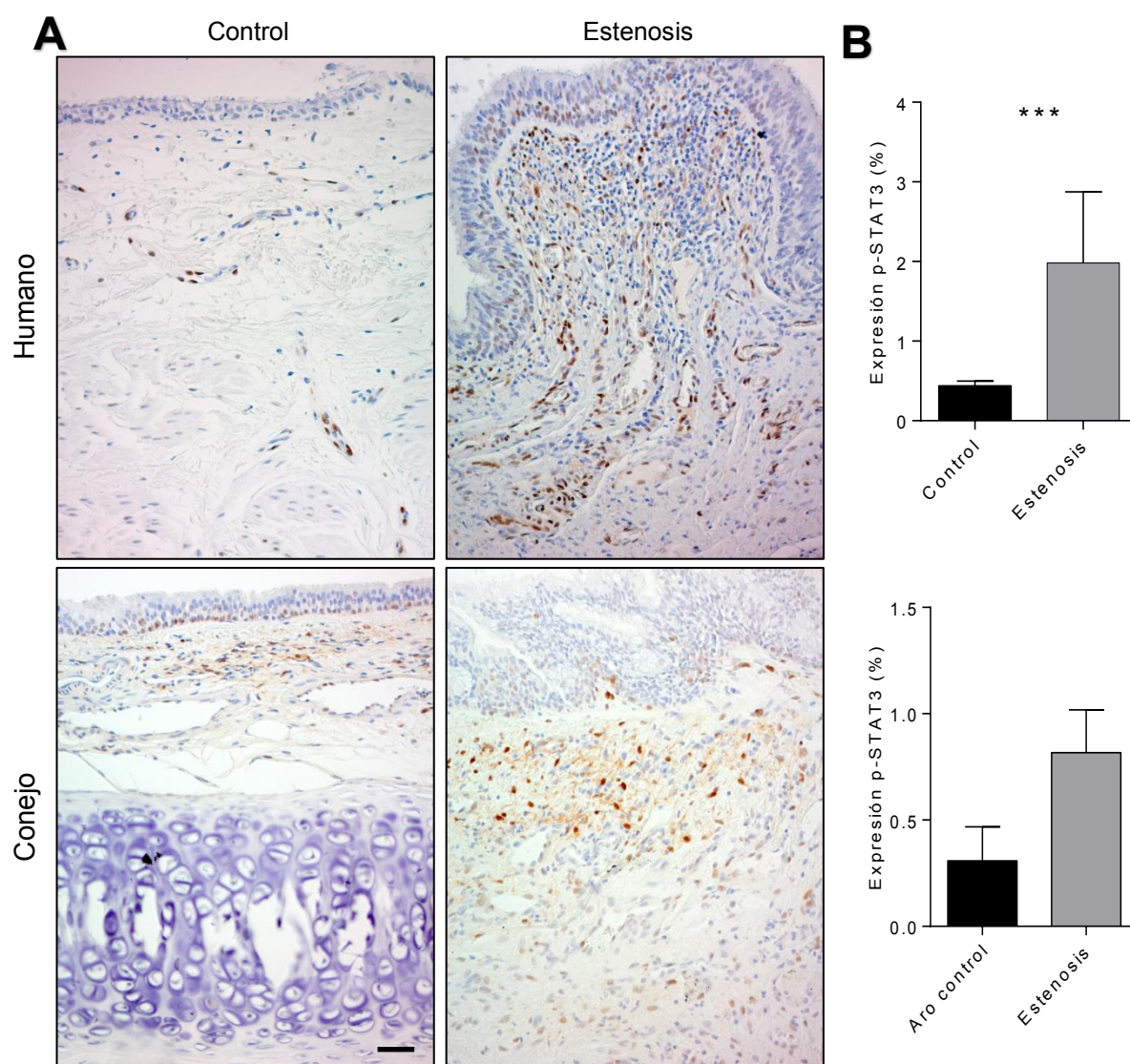
##### **9.4.1. Estudio de la expresión de p-STAT-3 en el tejido traqueobronquial de pacientes con estenosis traqueal y en el modelo animal**

Para determinar la expresión de STAT-3 fosforilada (p-STAT-3) en las muestras de estenosis traqueal humana y de animal de experimentación según el modelo propuesto se realizó un análisis inmunohistoquímico de la presencia de pSTAT-3 en dichas muestras.

En la figura 21 se muestran imágenes de secciones traqueales representativas de estenosis traqueal humana y en animal de experimentación teñidas mediante inmunohistoquímica para la detección de p-STAT-3, con los respectivos controles sanos para su comparación. En ellas se puede observar un aumento de p-STAT3 teñido en marrón en localización nuclear y de manera difusa en la zona de fibrosis submucosa de las muestras de estenosis tanto en humano como en el modelo animal en comparación con las muestras sanas. Esta observación se confirma en el análisis cuantitativo de las muestras donde se obtienen diferencias estadísticamente significativas de la mayor presencia de pSTAT-3 en las muestras de estenosis traqueal humanas respecto a los



controles sanos ( $***p=0.0007$ ). En el caso de los animales de experimentación se confirma el incremento de células p-STAT3, aunque no significativo, en los animales con estenosis al compararlo con el grupo control.



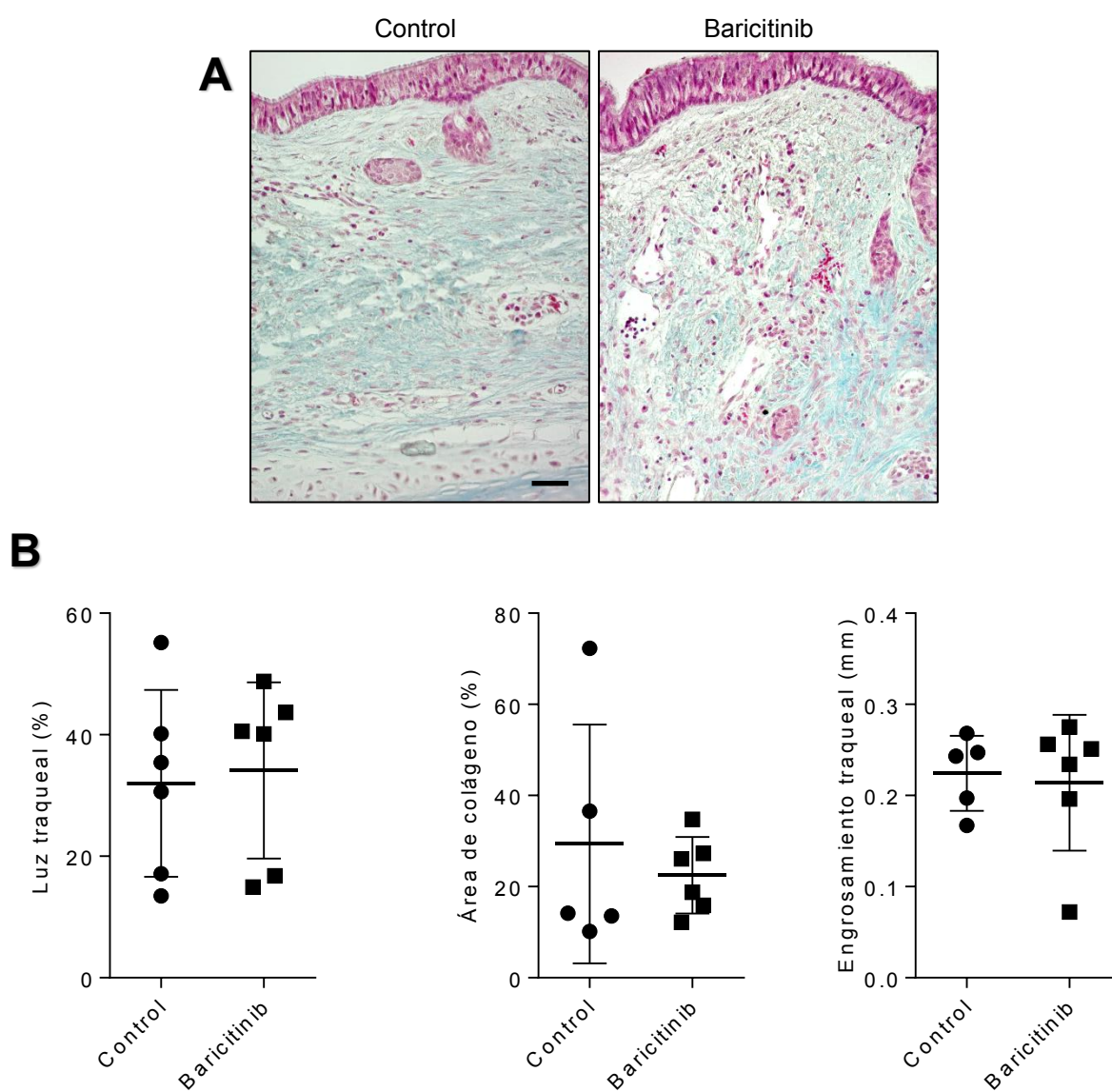
**Figura 21.** (A) Secciones de estenosis traqueal humana (fila superior) y de animal de experimentación (fila inferior) con sus controles sanos bajo (columna derecha) teñidos mediante inmunohistoquímica para detección de pSTAT-3. Barra 50μm (B) Análisis cuantitativo de las células p-STAT positivas por área

#### **9.4.2. Efecto del tratamiento con Baricitinib sobre el modelo animal de estenosis traqueal.**

Tras realizar un análisis de la presencia de p-STAT-3 en las muestras de estenosis traqueal humana y de animal de experimentación como muestra de su activación y participación en dicho proceso, se propuso observar el efecto de la administración de un inhibidor selectivo y reversible de la Janus quinasa (JAK) 1 y 2 denominado Baricitinib.

En la figura 22 se muestran secciones traqueales representativas de animal de experimentación teñidas mediante la tinción Tricrómica de Masson, comparándose los cambios en las muestras que recibieron Baricitinib respecto a las muestras control. En ambas muestras se identifica la presencia de un significativo engrosamiento submucoso, en su mayor medida secundaria a la presencia de un relevante acúmulo de colágeno similar en ambos casos y sin observarse aparentes incidencias sobre la luz traqueal.

Estos hallazgos se confirman en el análisis cuantitativo donde no se observaron diferencias significativas en cuanto a porcentaje de luz traqueal, porcentaje de área de colágeno y engrosamiento traqueal entre ambos grupos ( $p=0.6753$ ,  $p=0.8745$ ,  $p=0.8745$  respectivamente).



**Figura 22.** (A) Secciones traqueales en animal de experimentación A la izquierda control sano, a la derecha muestra con estenosis traqueal. Barra 50 $\mu$ m. (B) Análisis cuantitativo del porcentaje de luz traqueal, porcentaje de área de colágeno y engrosamiento traqueal (mm).

## **Discusión**

## **10. DISCUSIÓN**

La estenosis traqueal benigna de origen inflamatorio es una patología con gran impacto sobre la calidad de vida del paciente, tanto adulto como pediátrico, con necesidad de traqueostomía permanente o tratamientos crónicos de por vida en un porcentaje significativo de casos.

Aunque en la actualidad existen diversas opciones terapéuticas, todas ellas presentan limitaciones y por el momento no se han desarrollado tratamientos sobre la base etiopatogénica. Los tratamientos endoscópicos, aunque en general presentan complicaciones relativamente bajas, tienen tasas de recidivas elevadas ya que la aplicación de láser o dilataciones generan sucesivas reacciones inflamatorias que tienden a la reestenosis. Estos son tratamientos con eficacia habitualmente temporal presentando además una limitación añadida de tolerancia cuando la estenosis se localiza en vía aérea principal a diferencia de vía aérea más distal con mejor tolerancia por su carácter unilateral permitiendo una adecuada ventilación con el pulmón cuya vía aérea no presenta patología estenótica. La colocación de prótesis asociada a dilataciones previas pueden ser de utilidad en estenosis bronquiales, pero en vía aérea proximal (subglotis y tráquea) obliga en la mayoría de los casos a una traqueotomía asociada (prótesis de Montgomery) y la necesidad de revisiones frecuentes, recambios o recolocaciones con broncoscopias repetidas, y sin resolución definitiva en ocasiones. La cirugía de la estenosis traqueal, aunque puede ser curativa es en general una cirugía compleja y que precisa de amplia experiencia para asegurar resultados óptimos. Esta experiencia resulta difícil de

acumular por la dispersión de casos a nivel nacional sin claros centros de referencia salvo algunas excepciones puntuales. No obstante, a pesar de su potencial carácter curativo, la cirugía no está exenta de complicaciones pudiendo ser potencialmente graves incluyendo cierta tasa de mortalidad postoperatoria. Por estos motivos, se hace necesaria la investigación sobre los posibles factores etiológicos implicados en el desarrollo de la estenosis traqueal inflamatoria con el fin de profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de esta entidad y posteriormente identificar posibles dianas terapéuticas.

#### **10.1. PAPEL DEL TFG- $\beta$ EN LA ESTENOSIS TRAQUEAL DE ORIGEN INFLAMATORIA**

Como se ha comentado previamente, el TFG- $\beta$  tiene un papel relevante ya conocido en procesos de fibrosis y cicatrización. A nivel del aparato respiratorio la actividad de TFG- $\beta$  también ha sido descrita en diversas enfermedades inflamatorias de la vía aérea como la rinitis nasosinusal, el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>318</sup>, todas ellas con el denominador común de presentar una elevada remodelación de la vía aérea. De igual manera se ha documentado la participación de TFG- $\beta$  en la fibrosis pulmonar idiopática<sup>319</sup> relacionada con el conocido papel profibrótico sistémico de TFG- $\beta$ . Más concretamente, a nivel de la vía aérea, la sobreexpresión de TFG- $\beta$  en tejido de granulación ha sido descrita en trabajos como los de Lee et al.<sup>257</sup>, donde se refleja el aumento de expresión de TFG- $\beta$ 1 y VEGF a nivel epitelial y submucoso en muestras endoscópicas de pacientes con estenosis traqueal. Asimismo, existen experiencias como la descrita por Karagiannidis et al.<sup>320</sup> donde se recoge

un aumento de ARNm de TFG- $\beta$ 1 en la submucosa traqueal de pacientes con estenosis traqueal inflamatoria. A nivel experimental también se ha comunicado la determinación de TFG- $\beta$  en muestras de estenosis traqueal de animal de experimentación en estudios como los de Li<sup>321</sup> o Zhou<sup>322</sup>. En todas ellas, la existencia de un aumento de los niveles de TFG- $\beta$  en las muestras inflamatorias de estenosis traqueal, tanto humanas como de animal de experimentación, es constante. Además de la presencia de TFG- $\beta$  en el aparato respiratorio, también han sido estudiadas las posibles causas de su producción aumentada. Tschumperlin et al.<sup>234</sup> relacionaron la producción aumentada de TFG- $\beta$ 2 y endotelina con el stress mecánico del epitelio respiratorio en pacientes con asma, datos que podrían relacionar la producción de TFG- $\beta$  con la presión mecánica sufrida por el epitelio traqueal en las intubaciones prolongadas. Además, también ha sido relacionada con otros factores como la exposición tabáquica<sup>323, 324</sup>.

Siendo conocedores de la presencia de TFG- $\beta$  en la estenosis traqueal, en este trabajo se ha propuesto determinar marcadores que evidencien la actividad profibrótica general derivada de la presencia de TFG- $\beta$ , ya comentada en la literatura. Para ello, se eligieron determinados marcadores subrogados de dicha actividad de TFG- $\beta$  indicativos de fibrosis en muestras de estenosis traqueal humana y animal: la presencia de fibra colágena y de miofibroblastos mediante la determinación de células  $\alpha$ -actina positivas, existencia de CTGF y p-SMAD 2/3 (únicamente en muestras humanas), que relacionen la presencia de TFG- $\beta$  con los mecanismos fisiopatológicos de la estenosis traqueal.

### 10.1.1. Análisis del depósito de matriz colágena.

Tal y como se apuntaba previamente en la introducción, el TGF- $\beta$  induce el aumento de producción de matriz extracelular en forma de colágeno tipo I, III, V y VI, la disminución de producción de enzimas que degradan la matriz extracelular, y la producción de proteínas inhibidoras de dichas enzimas. Este hecho se ha observado en estudios experimentales previos como el de Chujo et al.<sup>325</sup>, en el que la administración de TGF- $\beta$  en ratones indujo una fibrosis subcutánea y la administración de CGTF tras TGF- $\beta$  condujo a una fibrosis crónica, generando un modelo animal en ratón de fibrosis dérmica. Esta administración seriada de CGTF tras TGF- $\beta$  resultó en una sustancial elevación de ARNm de colágeno 1 $\alpha$ 2. Yang et al.<sup>326</sup> observaron un aumento de la expresión de colágeno 1 $\alpha$ 1 tras la administración de TGF- $\beta$  a fibroblastos embrionarios humanos, pero no mediado por la vía Smad, sino con una marcada activación de la vía PI3K/AKT. Nigdelioglu et al.<sup>327</sup> confirmó el aumento de la expresión de enzimas que sintetizan serina y glicina necesarias para la producción de colágeno, tras la administración *in vitro* de TGF- $\beta$  a fibroblastos humanos en cultivo celular. Concretamente, en la estenosis traqueal de origen inflamatorio, el aumento de fibra colágena inducida por TGF- $\beta$  es un elemento observado en otros trabajos experimentales previos como el de Enyuan et al.<sup>328</sup>, donde se observó un aumento de ARNm de colágeno tipo I y III, así como ARNm de TGF- $\beta$  en vía aérea sobre un modelo de estenosis traqueal en ratón. Zhou et al.<sup>322</sup> también reportan el aumento de colágeno tipo I y III así como de TGF- $\beta$  en muestras de estenosis traqueal en animal de experimentación. En nuestra observación, tanto las muestras traqueales humanas de estenosis traqueal inflamatoria como las muestras del modelo animal de estenosis traqueal



mostraron, en la línea de los estudios previos, un aumento de matriz de colágeno a nivel submucoso evidenciada con la tinción Tricrómica de Masson, lo que condujo a un aumento del grosor de dicha capa produciendo la consecuente reducción de la luz traqueal.

#### **10.1.2. Análisis de celularidad $\alpha$ -actina positiva**

La diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos mediada por TGF- $\beta$  y su implicación en los fenómenos de fibrosis y cicatrización ha sido descrita en humanos previamente<sup>329</sup> así como su capacidad contráctil necesaria para la retracción cicatricial. El TGF- $\beta$ 1 actúa sobre el sistema dual antagónico constituido por el sistema WNT/ $\beta$ -catenina y el receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ). Estos dos sistemas de señalización actúan de manera opuesta en condiciones patológicas diversas, de tal manera que cuando la expresión de PPAR $\gamma$  aumenta, la señalización de WNT/ $\beta$ -catenina disminuye y viceversa<sup>330</sup>.

En nuestra observación, el aumento significativo de miofibroblastos en la capa submucosa de muestras traqueales humanas y del modelo animal de estenosis traqueal, determinados mediante inmunohistoquímica por la presencia de células  $\alpha$ -actina positiva, corrobora la actividad de TFG- $\beta$ . Ésta actividad consistente en la inducción de la diferenciación de fibroblastos a otras células epiteliales estromales y a miofibroblastos mediante la expresión de  $\alpha$ -actina de musculo liso también se confirma en la estenosis traqueal inflamatoria.

El modelo animal de estenosis traqueal presenta también dichos hallazgos al igual que otras experiencias similares que corroboran el papel de TFG- $\beta$  en la diferenciación de los miofibroblastos también *in vitro*. En la experiencia de Desmouliere et al.<sup>331</sup> la administración subcutánea de TFG- $\beta$ 1 a ratas da como resultado la formación de un tejido de granulación con abundantes miofibroblastos que expresan  $\alpha$ -actina. En otra experiencia *in vitro* se relaciona la diferenciación de los miofibroblastos inducida por TFG- $\beta$  en válvulas cardíacas porcinas<sup>332</sup>. Roy et al.<sup>333</sup> confirmó el papel fundamental para la diferenciación de los miofibroblastos inducida por TFG- $\beta$  mediante la transfección de longitudes variables de promotor de actina de musculo liso y administración de TFG- $\beta$  a fibroblastos de pulmón de rata al igual que la mutación inducida del gen de TFG- $\beta$  conllevó una reducción significativa en la expresión del promotor de actina, similar a la observación de Hautman et al.<sup>334</sup> donde la transfección del promotor de  $\alpha$ -actina a células de músculo liso aórticas de rata y posterior tratamiento con TFG- $\beta$ , indujo el aumento de expresión de  $\alpha$ -actina.

### 10.1.3. Análisis de presencia de CTGF

El aumento de producción de CTGF inducido por TGF- $\beta$  es conocido en la literatura en ámbitos clínicos múltiples como en la fibrosis hepática<sup>335</sup>, enfermedad cardíaca reumática<sup>336</sup>, endometrial<sup>337</sup>, nasosinusal<sup>338</sup> o fibrosis cutánea<sup>339</sup> entre otras. CTGF es una proteína rica en cisteína que desempeña un papel esencial en la formación de vasos sanguíneos, huesos y tejido conectivo. La expresión de esta proteína es inducida por la acción de TGF- $\beta$ , por lo que CTGF es mediador de varias de las acciones definitivas de TGF- $\beta$ , en particular de la función profibrótica induciendo la proliferación y diferenciación de

fibroblastos y el aumento de síntesis de matriz extracelular<sup>340</sup>. CTGF se encuentra sobreexpresado en la enfermedad fibrótica y presenta sinergia con TGF- $\beta$  potenciando las funciones profibróticas de éste para promover la fibrosis sostenida *in vivo*<sup>341, 342</sup>.

En nuestro estudio, la expresión submucosa de CTGF se encuentra aumentada en las muestras humanas y animales de estenosis traqueal de manera significativa en comparación con los controles sanos, confirmando por un lado la presencia de CTGF y su efecto profibrótico y secundariamente apoyando la hipótesis del efecto de TGF- $\beta$  en la estenosis traqueal inflamatoria, como marcador subrogado de su actividad.

Por un lado, la acción fibrótica de CTGF se ha observado en otras experiencias *in vitro* como la comunicada por Sonnylal et al.<sup>343</sup>, donde se observó una actividad fibrosante a nivel renal, cutáneo y pulmonar en ratas modificadas genéticamente para obtener una sobreexpresión de CTGF, asociada a una mayor proliferación de fibroblastos y mayor producción de matriz extracelular. A pesar de ello no se observó una mayor fosforilación de Smad3, sugiriendo la participación de otras vías de señalización celular diferente de TGF- $\beta$  como p38 o ERK 1/2 cuya activación si fue observada.

Por otro lado, la relación entre TGF- $\beta$  y CTGF como factores profibróticos relacionados entre sí ha sido documentada en otros estudios experimentales previos. En el estudio de Qi et al.<sup>344</sup>, la administración de CTGF indujo el

aumento de colágeno IV y fibronectina en células túbulo renales, mientras que la administración de CTGF y TGF- $\beta$  conllevó una mayor expresión de estas sustancias. TGF- $\beta$  estimuló la expresión de ARNm de CTGF y de la proteína de CTGF. Por otra parte la administración de anticuerpos contra TGF- $\beta$  o el receptor de TGF- $\beta$ II, produjo una inhibición de la expresión de CTGF, un efecto análogo al p17 observado en nuestra experiencia. Mori et al.<sup>345</sup> documentaron que la inyección subcutánea de TGF- $\beta$  durante 7 días consecutivos solo induce fibrosis transitoria, mientras que la coinyección de TGF- $\beta$  y CTGF induce fibrosis persistente en un modelo de fibrosis cutánea en ratón, apoyando la idea de la sinergia de acción profibrótica entre estos dos elementos. Wahab et al.<sup>346</sup> mostraron que CTGF mejora la ruta de señalización de TGF- $\beta$ /Smad mediante la supresión transcripcional de Smad7 mediante la inducción de un factor inhibidor de Smad7 (TIEG-1) evitando la acción inhibidora de Smad7 sobre la vía de TGF- $\beta$ . CTGF mejoró la fosforilación inducida por TGF- $\beta$  y la translocación nuclear de Smad2 y Smad3 en células mesangiales. Abraham et al.<sup>347</sup> observaron un aumento en la expresión constitutiva de CTGF en fibroblastos de esclerodermia tras tratamiento con TGF- $\beta$  y su supresión mediante TNF- $\alpha$ . A nivel cardíaco<sup>348</sup> también se ha confirmado experimentalmente la inducción de CTGF mediada por TGF- $\beta$  en fibroblastos cardíacos y miocitos, así como un aumento de colágeno tipo I y fibronectina.

#### 10.1.4. Análisis de presencia de p-SMAD2/3

La determinación de p-Smad2/3 constituye un marcador específico en la transmisión de señales desde el receptor TGF- $\beta$  hasta el núcleo celular por lo

que refleja de manera fehaciente la actividad de TGF- $\beta$ . En otras experiencias experimentales similares se relaciona claramente la actividad de TGF- $\beta$  con Smad en el contexto de enfermedades fibrosantes. Roach<sup>349</sup> observó un aumento de la expresión de proteínas y ARNm de Smad2/3 constitutiva y un aumento de la localización nuclear de Smad2/3 así como de  $\alpha$ -SMA en miofibroblastos humanos obtenidos de pulmones con fibrosis pulmonar. Hu<sup>350</sup> observó una expresión aumentada de Smad3 con el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 al igual que una reducción notable en la expresión de Smad3 y  $\alpha$ -SMA tras la transfección de dichas células con un plásmido anti Smad3. De igual manera, la supresión génica para la expresión de Smad3 en ratones conllevó a la supresión de la expresión de ARNm de procolágeno tipo I, atenuando la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en dichos animales<sup>351</sup>. En nuestro estudio, p-Smad2/3 solo pudo ser determinado en las muestras humanas donde se observó un aumento de la expresión de p-Smad2/3 de manera significativa en los tejidos de estenosis traqueal en comparación con controles sanos apoyando la idea de la activación de la vía de TGF- $\beta$  también en estenosis traqueal inflamatoria como entidad con una base fisiopatológica evidentemente fibrosante.

Los valores de todos los marcadores estudiados subrogados de actividad de TGF- $\beta$  (grosor colágeno, CTGF,  $\alpha$ -SMA y p-Smad2/3) medidos en muestras procedentes de estenosis traqueal humana y de animal de experimentación se encuentran significativamente elevados en comparación con los controles sanos **lo que parece confirmar el papel de TGF- $\beta$  también en el proceso inflamatorio de la vía aérea.**

## 10.2. MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL

Existen en la literatura varios modelos de estenosis traqueal en animal de experimentación. Uno de los animales más usados es el conejo ya que el abordaje de la vía aérea cervical es sencillo y su tráquea es bastante larga. Además, es un animal pequeño con cuidados sencillos por lo que presenta ventajas sobre otros modelos en animales mayores. En esa línea nuestro modelo ha sido realizado en conejo neozelandés albino siguiendo estas premisas. Se han descrito modelos en animales de experimentación distintos al conejo como el perro. Aunque su mayor tamaño traqueal permite con más facilidad abordajes endoscópicos no suele usarse en nuestro medio. El “Principio de Reemplazo” del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, exige en lo posible la búsqueda de animales con menores capacidades evitando primates y perros. Además, suelen precisar de procedimientos más complejos como intubación prolongada<sup>352, 353</sup> o secciones traqueales y reimplantes<sup>354</sup>. También han sido descritos modelos en roedores pequeños pero el escaso calibre de la vía aérea hace en ocasiones compleja la técnica quirúrgica<sup>355</sup>, con tasas de mortalidad altas debido al escaso diámetro traqueal sobre el cual una estenosis de escaso tamaño puede suponer una reducción importante de la luz traqueal global.

La mayoría de modelos se basan en generar una reacción inflamatoria sobre la mucosa traqueal tras un acceso quirúrgico a la misma. La intubación prolongada del animal de experimentación se ha propuesto en varios estudios. Es el método *a priori* con mayor analogía a la lesión en humanos por lo que

podría ser el más extrapolable. Sin embargo, el requerimiento de horas de intubación del animal, que en el caso de animales mayores puede ser largo, lo hace poco práctico a nivel experimental<sup>353, 356</sup>. Una alternativa frecuente en las referencias de la literatura es el uso de un material abrasivo sobre la mucosa traqueal para producir la reacción inflamatoria que conduzca a la estenosis de manera mecánica. Nakagishi<sup>357</sup> describió con este procedimiento tasas de estenosis de 22% a 82% en diámetro y desde 48% a 97% en sección transversal y Mady<sup>358</sup> una mediana de 57% estenosis con un rango variable entre el 34% y el 85%. En el estudio histológico confirmaron un aumento de la capa submucosa con aumento de colágeno y fibroblastos. McIlwain<sup>359</sup> comparó el uso de abrasivos de nylon con polipropileno con mayor eficacia de estos últimos, pero con tasas igualmente variables de estenosis. En algunos casos se añaden materiales químicos a la abrasión en el intento de conseguir mejores tasas de estenosis<sup>360</sup>. En general, los estudios de abrasión mecánica sobre la mucosa presentan la limitación de una mayor variabilidad en el grado de estenosis entre los sujetos y dificultades para obtener estenosis mayores al 70% de manera consistente adquiriendo esta tasa en el 25% o 50% de los animales estudiados<sup>357,361</sup>. El uso del electrocauterio ofrece un método sencillo de fácil acceso y barato para generar una lesión de la mucosa traqueal. Permite una intensidad constante de la quemadura aplicada reduciendo la variabilidad del uso de un abrasivo. Algunos estudios remarcan la necesidad de realizar lesiones circunferenciales para asegurar una estenosis adecuada ya que la electrocoagulación de pequeñas áreas dispersas puede no conseguir el resultado deseado<sup>362</sup>. En un estudio comparativo entre el uso de material abrasivo y el electrocauterio se obtuvieron más estenosis y de mayor grado en

los animales con este último procedimiento<sup>363</sup>. Se han descrito otros métodos para generar estenosis traqueal como el uso de diferentes variantes de laser<sup>364</sup>,<sup>365</sup> o transfecciones virales<sup>366</sup> más costosos y con menor disponibilidad general.

El tiempo de sacrificio del animal también es objeto de controversia. Algunos estudios previos postulan la consecución de la máxima estenosis en un tiempo variable entre la primera y tercera semana tras el procedimiento<sup>361,367</sup> aunque otros autores consideran la cuarta semana la ideal para una adecuada formación estenótica con tasas de estenosis luminal no inferiores al 70%<sup>368</sup>.

El modelo de nuestro estudio ha sido realizado en conejo albino adulto de Nueva Zelanda que ofrece las facilidades anatómicas y de cuidado previamente comentadas. Ante la variabilidad de la abrasión mucosa, la fácil disponibilidad de electrocauterio y la necesidad de obtener estenosis significativas se ha optado por éste método para realizar la lesión traqueal. De igual manera, el sacrificio del animal de experimentación se realizó cuatro semanas después del procedimiento asegurando la consecución de estenosis significativas.

En relación con los hallazgos histopatológicos, las muestras procedentes del modelo experimental reproducen los hallazgos obtenidos en muestras de estenosis traqueal humana: una disminución del calibre de la luz traqueal a expensas de un aumento de grosor de la capa submucosa secundaria a un aumento de depósito de colágeno y de presencia miofibroblástica medida por la presencia de células  $\alpha$ -actina positivas así como la presencia elevada de CTGF, todos ellos marcadores relacionados con la activación del propio TFG- $\beta$ . Por todo



ello, el modelo animal propuesto de estenosis traqueal reproduce los cambios morfológicos, histopatológicos y moleculares de estenosis traqueal inflamatoria mediados por TGF- $\beta$  presentes en el humano, proporcionando un modelo preclínico fiable para analizar el impacto de un antagonista de TGF- $\beta$ .

### 10.3. P17 COMO INHIBIDOR DE TGF- $\beta$ SOBRE EL MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL

Tras tener una evidencia consistente sobre el papel de TGF-  $\beta$  en la patogénesis de la estenosis traqueal inflamatoria y obtener un modelo animal experimental de estenosis traqueal representativo de los cambios morfológicos e histopatológicos inducidos por TGF-  $\beta$ , se han investigado los resultados sobre la inhibición de TGF-  $\beta$  mediante el p17 en este modelo.

P17 mostró efectos antifibróticos significativos observándose una significativa **reducción del espesor de la capa submucosa a expensas de una disminución de fibras de colágeno puesta de manifiesto mediante la tinción de Masson, asociado a una disminución significativa de la expresión de  $\alpha$ -SMA y CTGF**, inducidos por TGF- $\beta$ . Sin embargo, la reducción del tejido fibrótico en la submucosa traqueal fue acompañada por una **mejoría no significativa en la estenosis luminal traqueal**.

En el estudio de posibles terapias de la estenosis traqueal inflamatoria sobre su base fisiopatológica inflamatoria, existen en la literatura varios estudios

a nivel experimental que analizan el potencial efecto terapéutico de diversas sustancias como eritromicina, penicilina o budesonida<sup>321,322</sup>. Más concretamente, en relación a la inhibición de TGF- $\beta$  y analizando otras experiencias similares, se ha empleado previamente la inhibición directa de TGF- $\beta$ 1 de forma tópica en ensayos clínicos con ratones con esclerodermia inducida por bleomicina, bien con anticuerpos (Yamamoto et al<sup>369</sup>) o bien mediante un péptido inhibidor P144 (Santiago et al<sup>239</sup>) con una reducción significativa de la aparición de fibrosis dérmica y de la cantidad de colágeno depositado en la hipodermis, así como en la detección de células  $\alpha$ -SMA positivas, fibroblastos p-SMAD2/3 positivos y CTGF. A nivel sistémico, existe experiencia en la administración oral de BMP7 en la reversión de la fibrosis renal establecida en ratones<sup>370</sup> y en fibrosis hepática, administrando vía oral un anticuerpo monoclonal de TGF- $\beta$  (1D11)<sup>371</sup> con mejoría macroscópica hepática y disminución de colágeno, hidroxiprolina y PAI-1 como marcadores de fibrosis, y P144 intraperitoneal, con reducción de los depósitos de colágeno y células  $\alpha$ -SMA<sup>372</sup>. A nivel respiratorio, se ha comprobado la reducción de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en hamsters tras instilación intratraqueal del receptor soluble de TGF- $\beta$  como propio inhibidor, con disminución de hidroxiprolina y de actividad prolihidroxilasa, y por tanto de la formación de colágeno pero sin cambios en celularidad y proteínas del lavado bronquiloalveolar<sup>373</sup>. También se ha observado la reducción de la fibrosis secundaria a bronquiolitis obliterante en modelos animales de ratones mediante el bloqueo de TGF- $\beta$ 1 con la administración soluble del receptor de TGF- $\beta$  tipo III<sup>374</sup> y mediante el bloqueo génico de la expresión de Smad3<sup>375</sup>. En esta línea, también existen experiencias de inhibición de la vía de TGF- $\beta$ , no a nivel de la

unión con su receptor sino mediante el bloqueo de actividad intracelular de Smad, fundamentalmente Smad3. Se han comunicado estudios experimentales en los que ratones con supresión génica de Smad3 fueron resistentes a la fibrosis pulmonar inducida por la sobreexpresión de TGF- $\beta$  conseguida mediante transfección celular<sup>376</sup> o por bleomicina<sup>351</sup>. Estas experiencias podrían plantear también la diferente eficacia de la inhibición de la vía a distintos niveles de su regulación.

Concretamente, P17 ha sido usado previamente como bloqueador de TGF- $\beta$ 1 reduciendo la fibrosis retroperitoneal inducida por cáncer gástrico en humanos e *in vitro*<sup>377</sup> y en combinación con P144 el tratamiento de las lesiones neovascularizantes coroideas<sup>378</sup> así como en artritis inducida por colágeno en ratas<sup>379, 315</sup>. En el tratamiento de estenosis inflamatoria de la vía aérea, el estudio más comparable es el realizado por Simpson et al<sup>380</sup>, en el que se aplica de forma tópica e intravenosa el anticuerpo antiTGF- $\beta$  1D11 en perros sobre los que previamente se había realizado una lesión térmica en la región subglótica causando una estenosis. Los resultados mostraron tanto una reducción de la estenosis traqueal como un aumento del tiempo de supervivencia de estos perros respecto a los del grupo control.

Estas experiencias evidencian el potencial inhibitorio de p17 y de la vía de TGF- $\beta$  en el tratamiento de los procesos fibrosantes y en concreto en el tratamiento de la estenosis traqueal inflamatoria. Nuestros resultados se encuadran en la línea de las experiencias previas, avalando una evidencia de reducción del componente fibrótico tras la inhibición de TGF- $\beta$ , pero esta

inhibición no se ha traducido en una mejoría significativa en la luz traqueal en nuestra observación. La existencia en nuestros datos de una correlación pobre y no significativa entre el grosor de la capa colágena submucosa y el área luminal traqueal en el modelo experimental podría sugerir que el proceso fibrótico no es el único involucrado en la patogénesis del proceso estenótico con impacto sobre la reducción de la luz traqueal, de tal manera que otros componentes como el edema submucoso, la hiperplasia epitelial o los cambios estructurales como el daño del cartílago<sup>365</sup> podrían contribuir a reducir la luz traqueal y limitar el beneficio. Asimismo, nos planteamos la influencia de otras vías de administración, de la dosis o concentraciones de p17 utilizadas, así como la potencial implicación de otras vías moleculares en la fisiopatología de la estenosis traqueal inflamatoria que podría influir en los resultados.

### **10.3.1. Factores con posible influencia sobre los resultados**

#### **10.3.1.1. Vía de administración de p17**

A diferencia del estudio llevado a cabo por Simpson et al.<sup>380</sup> la aplicación del péptido en nuestro caso es tan solo tópica y no sistémica. La condición de la molécula lipofílica del p17 favorece su administración en esponjas de lipogel, cuya administración no puede ser endoluminal. Aunque la aplicación local por implante quirúrgico directo de esponjas que contienen p17 no es extrapolable para tratar la estenosis humana, permitió una vía de administración fiable del p17. No se dispone de información respecto a la cantidad final de p17 que

consigue difundir por esta vía hacia el espacio submucoso o la concentración alcanzada a ese nivel, por lo que la administración tópica podría no ser suficiente para obtener un resultado significativo en cuanto a luz traqueal se refiere. La opción de una administración por vía sistémica conlleva los inconvenientes de una distribución generalizada por el organismo y no específica en la localización de interés permitiendo el acumulo de p17 en tejido sano, así como la potencial inhibición de TGF- $\beta$  a nivel sistémico con efectos desconocidos, pero probablemente no deseables, dadas las múltiples funciones de TGF- $\beta$  en el resto del organismo. Por otra parte, la administración por vía oral podría ser inefectiva ya que la estructura peptídica de p17 es susceptible de ser degradada en el tubo digestivo<sup>381</sup>. Existen experiencias previas del uso de p17, o análogos como p144, en suspensión salina de dimetilsulfóxido<sup>382</sup> o en la composición del lipogel en presencia de dimetilsulfóxido al 5%<sup>383</sup> pero ambas estrategias fueron restringidas debido a la presencia de toxicidad de éste<sup>384</sup>.

#### **10.3.1.2. Dosis y concentración de p17**

Debido a que la cantidad de péptido activo en el tejido traqueal es difícil de determinar, se usó empíricamente un gran exceso en la dosis de administración de p17 considerando los datos de estudios locales y sistémicos anteriores ya que no existe una dosis estandarizada o previamente validada. Asumimos una administración eficiente porque resultó en una reducción significativa de la fibrosis, pero quizá concentraciones más altas podrían tener un mayor impacto sobre la estenosis traqueal ya que el p17 es un inhibidor competitivo del receptor de TGF- $\beta$  y por tanto la concentración alcanzada es un factor determinante de su efectividad.

### 10.3.1.3. Otras moléculas y vías moleculares

Aunque TGF- $\beta$  es un factor clave en la regulación de la fibrosis y cicatrización no es la única molécula involucrada en dicho proceso ni la única vía intracelular con regulación sobre el mecanismo de fibrosis y cicatrización. Además de las dos vías estudiadas (TGF- $\beta$ /Smad y JAK-STAT3, mediada por IL-6) existen otras vías de regulación intracelular clásicamente implicadas en el control de la actividad inflamatoria que podrían contribuir en la estenosis traqueal inflamatoria.

Se han descrito otras vías moleculares implicadas en el proceso de fibrosis como la vía p38/MAPK y PI3K/AKT/mTOR<sup>385</sup> al igual que JNK, TAK1, WNT<sup>386,387</sup> o Notch<sup>388</sup>. La vía HIPPO<sup>389</sup>, aunque menos frecuente, también se ha relacionado con el control de la fibrosis. Además, moléculas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o las interleukinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-13 también participan activamente en el proceso fibrótico<sup>390</sup>.

La vía intracelular p38/MAPK (mitogen-activated protein kinasa) está implicada en procesos neuroinflamatorios y de remodelado y fibrosis cardíacos<sup>391-393</sup>. La vía PI3K/AKT/mTOR es otra vía de regulación intracelular implicada fundamentalmente en la oncogénesis y en inmunomodulación, pero también han sido descritas sus implicaciones en el control inflamatorio mediado por linfocitos<sup>394</sup>. Se ha descrito la participación de la vía WNT<sup>395</sup> en la fibrosis pulmonar observándose aumento de los receptores de WNT, Lrp5 y 6 en células de sangre periférica. Además, ratones con bloqueo genético de Lrp5 tuvieron

resistencia a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, sin embargo no les confirió protección contra la fibrosis inducida por TGF. Existe la posibilidad de que a pesar de una inhibición de la vía TGF algunas de estas vías alternativas mantengan actividad profibrotica en la estenosis traqueal inflamatoria. De hecho, son conocidas las regulaciones cruzadas que existen entre algunas de estas vías de señalización intracelular y TGF de tal manera que TGF- $\beta$ 1 es también capaz de estimular la señalización intracelular no Smad, con posibilidad de activación de algunas de estas vías como MAPK, Rho y PI3K-AKT al igual que WNT<sup>330</sup> entre otras.

El papel de las citoquinas en el desarrollo de la inflamación y fibrosis también ha sido descrito<sup>390</sup>. Se ha relacionado a la familia de la IL-1 con la fibrosis pulmonar apareciendo elevada en varias experiencias *in vitro* de modelos animales de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y también en broncoaspirado de pacientes con fibrosis pulmonar<sup>4396</sup>. Las citoquinas dependientes de los linfocitos Th2 IL-4 y IL-13 pueden inducir la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos en una gran variedad de tejidos<sup>397-401</sup>. IL4 es capaz de inducir la síntesis de colágeno derivada de fibroblastos en piel humana<sup>402</sup> y su inhibición mejora la fibrosis hepática<sup>403</sup> y dérmica en diversos modelos experimentales en ratones<sup>404,405</sup>. IL13 ha mostrado efectos profibróticos en varios modelos experimentales<sup>406-410</sup> como a nivel pulmonar donde la sobreexpresión de IL13 conlleva un significativo aumento en la fibrosis subepitelial de la vía aérea<sup>411</sup> y se ha propuesto como posible diana terapéutica en fibrosis<sup>406,412-415</sup>. IL-5 también juega un papel importante en la fibrosis a través del reclutamiento, diferenciación y activación de eosinófilos. Los eosinófilos son

una fuente importante de citoquinas pro-fibróticas y factores de crecimiento, como TGF- $\beta$ 1 e IL-13<sup>405,416-417</sup> en una variedad de enfermedades que incluyen el rechazo de aloinjertos de piel y la fibrosis pulmonar. IL-17 ejerce su función principalmente en las células mieloides, las células epiteliales y las células mesenquimales aumentando la granulopoyesis y el reclutamiento de leucocitos, principalmente neutrófilos. También se ha demostrado IL-17 elevada en el lavado bronquioloalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar, con el reclutamiento de neutrófilos como un predictor importante de mortalidad temprana en pacientes con fibrosis pulmonar<sup>418,419</sup>. Varios estudios han sugerido una posible contribución para IL-17A en el desarrollo de enfermedades fibroproliferativas crónicas<sup>420</sup> como la presencia aumentada de IL-17 en la fibrosis cutánea inducida por bleomicina o en fibrosis cardíaca<sup>421,422</sup> así como en el desarrollo de fibrosis pulmonar después de la exposición a bleomicina relacionando a su vez la producción de IL-17A con TGF- $\beta$ 1<sup>419</sup>.

Los miembros de la familia de PDGF (*platelet derived growing factor*) son mitógenos potentes y quimioatrayentes para las células fibrogénicas en la mayoría de los órganos que impulsan el reclutamiento y la proliferación de estas células en los sitios de lesión tisular<sup>423</sup>. Su implicación en los procesos de fibrosis e inflamación han sido descritos en multitud de órganos y sistemas como en riñón, medula ósea, hígado, corazón, gastrointestinal, vascular, ojo, pulmón, fibrosis de origen neoplásico y esclerosis sistémica<sup>424</sup>. Pero además han sido descritas funciones profibróticas propias con capacidad de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos *in vitro*<sup>425</sup> o inducción de fibrosis hepática en ratones transgénicos para Smad3 aunque atenuada<sup>426</sup>, por lo que también



pueden mantener actividad fibrótica en ausencia de activación de la vía de TGF- $\beta$ . No obstante, al igual que en otras vías, la regulación cruzada entre PDGF y TGF- $\beta$  también es conocida<sup>427</sup>.

A pesar de la regulación cruzada que existe entre TGF- $\beta$  y algunas de estas vías de señalización intracelular o algunas de las interleuquinas, también ha sido descrito el desarrollo de fibrosis independiente de TGF- $\beta$  como en el caso de algunos estudios experimentales donde se observó fibrosis hepática inducida por IL-13<sup>433</sup> o fibrosis tubulointersticial renal independientes de TGF- $\beta$ <sup>429</sup>.

#### **10.3.1.4. Otras vías moleculares: VEGF y edema submucoso**

El VEGF es una citoquina con implicaciones en los mecanismos de cicatrización de las heridas. Es expresada por las células epiteliales que migran para cubrir el defecto de la herida durante las primeras etapas de la cicatrización, considerándose la responsable de la angiogénesis y aumento de la permeabilidad vascular. Tras la cobertura epidérmica, la expresión de VEGF disminuye dando lugar a una normalización de la permeabilidad vascular. Un posible fracaso de la cobertura epidérmica puede inducir la expresión prolongada de VEGF por células epiteliales y macrófagos conduciendo a una mayor angiogénesis e hiperpermeabilidad vascular prolongadas lo que conduce finalmente a un crecimiento aberrante de tejido en forma de tejido de granulación<sup>430</sup>.

La producción de VEGF en tejido de granulación de estenosis traqueal ha sido objetivada en experiencias previas como la de Pokharel<sup>430</sup> donde se relaciona directamente la presencia de VEGF con la severidad de la estenosis, o en el estudio de Lee<sup>257</sup> donde se observó la presencia aumentada de VEGF y TGF- $\beta$  así como un aumento de vascularización en tejido de granulación obtenido de pacientes con estenosis inflamatoria de vía la aérea. *In vitro*, TGF- $\beta$ 1 estimuló la producción de VEGF y su ARNm en fibroblastos cultivados por lo que parece que queda patente la contribución de VEGF a la estenosis traqueal y su relación con TGF- $\beta$ . Si bien la producción de VEGF se ha relacionado con TGF- $\beta$ , no es la única sustancia que estimula su producción ya que también ha sido relacionado el aumento de VEGF con otras moléculas como IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5 e IL-13 o PGE2<sup>431</sup>. De tal manera que el posible aumento de VEGF inducido por otras vías distintas a la estimulada por TGF- $\beta$  podrían tener su implicación en el mantenimiento de su función angiogénica y de aumento de permeabilidad vascular que contribuiría a mantener cierto grosor de la pared traqueal mediante un edema submucoso. Se ha investigado la eficacia de inhibir la producción de VEGF inducida por distintas vías. Se ha estudiado la utilidad de los corticosteroides, el INF- $\gamma$  o la eritomicina. Lee<sup>257</sup> observó que el tratamiento con un inhibidor selectivo de Smad3 (SIS3) y UO126 inhibió la fosforilación de la vía MAPK p44/42 y atenuó la posterior producción de VEGF por los fibroblastos. Una baja concentración de eritromicina (1  $\mu$ g/ml) inhibió la producción de VEGF inducida por TGF- $\beta$ 1, pero no el uso de dexametasona. Wen<sup>431</sup> inhibió VEGF inducido por las tres isoformas de TGF- $\beta$  mediante la administración de INF- $\gamma$  pero no la inducida por IL-1 $\beta$ .

#### 10.3.1.5. Transición epitelio mesénquima

Se ha demostrado que el TGF- $\beta$  induce una "transición epitelial-mesénquima" en células mesoteliales humanas diferenciadas de tal manera que las células epiteliales abandonan su diferenciación para formar parte del mesénquima generalmente como fibroblastos que contribuyen a la inflamación y la fibrosis<sup>432,433</sup>. Aunque es conocido el efecto inducido por TGF- $\beta$ , se han descrito otras vías moleculares con capacidad de estimular la transición epitelio-mesénquima como ET-1, NOTCH, CAV-1, Wnt, NOX4 y HIF-1 $\alpha$  inducido por hipoxia<sup>438</sup>, por lo que en ausencia de efecto o bloqueo de TGF- $\beta$  este fenómeno podría mantenerse por otras vías y contribuir al proceso fibrótico.

#### 10.3.1.6. Autofagia celular

La autofagia es un proceso celular de degradación de organelas dañadas, agregados de proteínas y otras macromoléculas en el citoplasma mediado por lisosomas y regula la muerte celular en condiciones fisiológicas normales y patológicas<sup>434,435</sup>. Se ha descrito previamente el factor protector antifibrótico de este fenómeno en experiencias *in vitro* previas. A nivel renal, la delección genética de genes que regulan la autofagia (Atg7) estimuló la expresión de TGF- $\beta$ /Smad4 conduciendo a una mayor fibrosis tubulointersticial y la estimulación de la transición epitelio-mesénquima<sup>436</sup>, por lo cual, la autofagia realiza un papel regulador de la expresión de TGF- $\beta$  en sí mismo. Aunque se ha reportado en experiencias como la de Qin<sup>437</sup> la reducción de la autofagia celular en modelo animal de estenosis traqueal como potencial mecanismo que

contribuiría a reducir la luz traqueal, se necesitan más estudios para determinar la contribución de este fenómeno en la estenosis traqueal.

### **10.3.2. Evaluación de la estructura del cartílago del tejido traqueal en el modelo animal**

En el análisis de la estructura del cartílago traqueal, se observaron áreas de disminución de grosor y densidad del cartílago traqueal en las muestras de estenosis traqueal del modelo animal. Tras la aplicación de p17 no se observaron diferencias significativas en cuanto al daño cartilaginoso entre los animales que recibieron p17 y los que recibieron salino, por lo que en nuestro estudio p17 no tuvo efectos sobre el cartílago traqueal.

A pesar de ser la vía de TGF- $\beta$  una vía eminentemente intracelular y el cartílago un tejido escasamente celular, hay evidencias del activo papel de TGF- $\beta$  en la función cartilaginosa<sup>438</sup> así como su presencia en líquido sinovial y su capacidad de difusión al cartílago articular<sup>439</sup>. Concretamente el TGF- $\beta$  promueve la síntesis y desarrollo del cartílago<sup>440</sup> desempeñando un papel crítico en la regulación de la diferenciación de condrocitos desde etapas tempranas a terminales, incluyendo condensación, proliferación, diferenciación terminal y mantenimiento de condrocitos. En la experiencia de Albro<sup>441</sup>, la suplementación con TGF- $\beta$  al tejido cartilaginoso *in vitro* produjo una producción aumentada y homogénea del mismo. En la observación de Keller<sup>442</sup>, la inhibición de Smad1 conllevó una disminución del grosor del cartílago. Por otro lado, Tekari<sup>443</sup>

evidenció una mayor expansión de condrocitos bovinos cultivados *in vitro* y una mayor producción de glucosaminoglucanos bajo la administración exógena de TGF- $\beta$ , así como una reducción de estos parámetros mediante el bloqueo de TGF- $\beta$ . Estas experiencias confirman el papel de TGF- $\beta$  en la producción de cartílago, de tal manera que cabe la hipótesis de que la inhibición de TGF- $\beta$  por p17 justifique la ausencia de mejoría en el grosor y densidad del cartílago traqueal observada en nuestra experimentación.

Por otra parte se ha observado en algunos estudios la implicación de la lesión cartilaginosa en el grado de estenosis traqueal en el modelo animal de estenosis traqueal. Cabría pensar que la contribución de la lesión cartilaginosa a la contribución de la estenosis traqueal, podría estar basado en el desarrollo de cierto componente malácico al perder la rigidez del armazón cartilaginoso con la consecuente reducción de la luz traqueal en un mecanismo análogo al humano. A nivel experimental existen algunas evidencias de la contribución de la lesión cartilaginosa a la estenosis traqueal. En la experiencia de Roh<sup>365</sup> se relaciona el grado de estenosis traqueal con la extensión del daño cartilaginoso. McIlwain observó un mayor grado de estenosis en aquellos animales que presentan cartílago traqueal expuesto tras la creación de la estenosis traqueal con abrasión en conejos<sup>359</sup>.

#### 10.4. ANÁLISIS DE BARICITINIB COMO INHIBIDOR DE JAK/STAT SOBRE EL MODELO EXPERIMENTAL DE ESTENOSIS TRAQUEAL

En el análisis de expresión de pSTAT-3 como marcador de la activación de la vía JAK/STAT sobre las muestras de estenosis traqueal humanas y en animal de experimentación se observó una expresión significativa de pSTAT-3 en las muestras de estenosis respecto a las muestras control sanas, tanto en tejido humano como en animal de experimentación. Por ello, **en nuestro estudio parece confirmarse la participación de la vía JAK/STAT en el desarrollo de estenosis traqueal humana de origen inflamatorio** y de igual manera, **el modelo animal de estenosis traqueal reproduce este incremento de la activación de la vía JAK/STAT**. Sin embargo, la inhibición de la vía JAK/STAT mediante Baricitinib por vía oral sobre el modelo animal de estenosis traqueal no ha mostrado diferencias significativas en cuanto a porcentaje de luz traqueal, porcentaje de área de colágeno y engrosamiento traqueal entre los animales que recibieron Baricitinib y los que recibieron salino.

Baricitinib ha demostrado su potencial efecto terapéutico mediante la inhibición de la vía JAK/STAT en varias experiencias previas de enfermedades reumatológicas, sobre todo en artritis reumatoide<sup>306-309</sup>, si bien no hay experiencias conocidas de su uso en estenosis traqueal inflamatoria. En la mayoría de estudios y ensayos clínicos se consigue una respuesta tras 12 semanas de tratamiento con 4mg de Baricitinib<sup>306-309,444</sup>. También existen evidencias de eficacia en ensayos para el tratamiento de psoriasis<sup>445</sup> a dosis de 8 a 10 mg en el plazo de 8 a 12 semanas y en lupus eritematoso sistémico<sup>446</sup>. Se han realizado estudios doble ciego, aleatorizados y controlados con placebo

para evaluar dosis ascendentes de Baricitinib en voluntarios sanos consiguiendo el valor máximo de concentración plasmática dentro de las 1,5 horas posteriores a la administración, y la inhibición de la fosforilación de STAT3 *ex vivo* mostró una adecuada correlación con las concentraciones plasmáticas de Baricitinib<sup>447</sup>. En nuestro estudio se optó por una dosis netamente mayor (20mg/día) para evitar limitaciones relacionadas con posibles dosificaciones infraterapéuticas. Se ha comunicado que la vida media promedio de Baricitinib es más corta, particularmente en pacientes que pesan  $\leq 40$  kg, por lo que recomiendan dosificación frecuente de Baricitinib hasta 4 veces al día en pacientes que pesen  $< 20$  kg para obtener una adecuada área bajo la curva<sup>448</sup>. Este hecho podría tener su influencia sobre nuestros resultados por el bajo peso del animal de experimentación.

Desconocemos si en nuestro caso la administración de Baricitinib consiguió una reducción en la expresión de p-STAT3 ya que en este caso se propuso analizar marcadores puramente clínicos. Existen evidencias previas de los inhibidores de la vía JAK/STAT donde se confirma su actividad inhibitoria *in vitro* a nivel molecular. Se ha observado la reducción en la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN $\alpha$  en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y monocitos así como la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6<sup>448,449</sup>. También se ha observado esta inhibición en estudios experimentales de modelos murinos de artritis reumatoide<sup>305</sup> y en experiencias *in vivo* como la de Boyle<sup>450</sup> donde se usa Tofacinib, un inhibidor de JAK/STAT análogo a Baricitinib, consiguiendo una reducción en la expresión de p-STAT1 y p-STAT3 en muestras sinoviales de pacientes con artritis reumatoide. Comparativamente, se ha descrito que

Baricitinib parece conseguir una menor inhibición de la señalización de JAK1/3 que Upadacitinib y Tofacitinib, mientras que todos ellos sí consiguen una buena inhibición en la señalización de las citoquinas dependientes de JAK2/2 y de JAK2/TYK2<sup>310</sup>. Baricitinib inhibe JAK1 y JAK2 pero tiene una potencia menor contra TYK2 y JAK3 *in vitro*<sup>310</sup>.

En nuestro caso consideramos que el escaso tamaño muestral disponible en ambos grupos puede ser el principal factor limitante relevante para la posibilidad de observar diferencias por lo que futuros estudios con tamaños muestrales mayores podrían ser propuestos para determinar con mayor fiabilidad el papel de los inhibidores de la vía JAK/STAT en el tratamiento de la estenosis traqueal inflamatoria.

## 10.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El estudio realizado está sujeto a una serie de limitaciones que pueden tener su influencia en mayor o menor proporción sobre los datos obtenidos. Su diseño experimental hace inherente al mismo las limitaciones propias de este tipo de estudios y hace difícil la extrapolación de los resultados a una población clínica.

Existen algunas limitaciones en relación al diseño del procedimiento experimental. En este sentido, tal y como se ha comentado previamente, la dificultad a la hora de homogeneizar la intensidad de la quemadura con electrocauterio a pesar de ser realizada con la misma intensidad en el dispositivo



puede suponer una limitación. De igual manera la aplicación de p17 en una esponja de lipogel sobre la tráquea no es una vía de administración extrapolable a una población clínica y podría presentar limitaciones en conjunto con la dosis administrada y en la consecución de una concentración efectiva de p17 en el tejido, todo ello directamente relacionado con el mecanismo de acción por inhibición competitiva del receptor de TGF-  $\beta$ .

El limitado número del tamaño de la muestra disponible es en sí misma una limitación ya que un mayor tamaño muestral habría ayudado a obtener mayor potencia estadística. Además, la existencia de casos con mortalidad precoz (antes de las 4 semanas) de algunos de los especímenes reduce la información obtenida. Tal y como se ha comentado en la discusión relacionada con el modelo experimental, el sacrificio a las 4 semanas se estableció según experiencias previas, asegurando la obtención de un mayor número de animales con estenosis y en rangos significativos sobre los cuales poder observar cambios con la administración de p17. Además, podría conducir a estenosis crítica de la vía aérea del animal que condujera a su muerte. Por otro lado, cabe la duda de si la inclusión de los animales con mortalidad precoz podría suponer alguna modificación en los resultados, teniendo en cuenta que el grupo con mayor mortalidad precoz se da en el grupo control sin tratamiento, es decir el que no recibe p17. Si, tal y como cabría suponer, estos animales mueren en su mayoría por estenosis crítica de la vía aérea, existe la duda de si podría haber habido diferencias significativas en cuanto a la luz traqueal si se hubieran incluido estos animales en el estudio.

## **Conclusiones**

## 11. CONCLUSIONES

1.- El modelo animal de estenosis traqueal reproduce los cambios morfológicos, histopatológicos y moleculares de estenosis traqueal inflamatoria mediados por TFG- $\beta$  observadas en el humano y constituye un modelo preclínico válido para probar el impacto de un antagonista de TGF- $\beta$ .

2.- El TFG- $\beta$  desarrolla un papel relevante en la fisiopatología de la estenosis traqueal benigna de origen inflamatorio, en humano y animal de experimentación, objetivado por la sobreexpresión de los marcadores subrogados de actividad de TFG- $\beta$ : colágeno submucoso, p-Smad 2/3, CTGF y  $\alpha$ -SMA.

3.- El tratamiento con el antagonista de TGF- $\beta$ , P17 redujo significativamente la fibrosis submucosa, la celularidad miofibroblástica y la presencia de CTGF pero no incrementó significativamente la luz traqueal en este modelo de estenosis traqueal postinflamatoria.

4.- El tratamiento con el antagonista de TGF- $\beta$ , P17 no produjo mejorías significativas en cuanto a la disminución de grosor y densidad del cartílago traqueal presentes en la estenosis traqueal de animal de experimentación.

5.- La vía intracelular JAK/STAT se encuentra activada en la estenosis traqueal humana. El modelo animal de estenosis traqueal reproduce los cambios moleculares de la activación de esta vía.

6.- El tratamiento con un inhibidor selectivo de JAK, Baricitinib, no mostró cambios en cuanto a porcentaje de luz traqueal, porcentaje de área de colágeno y engrosamiento traqueal en la estenosis traqueal de animal de experimentación.

## **12. BIBLIOGRAFIA**

1. Lagman Sadler TW. Aparato respiratorio. En: Sadler TW Embriología médica. 8ª. Madrid: Médica paramericana; 2007. p. 252-4.
2. Grillo. HC. Surgery of the trachea and bronchi. Hamilton: BC Decker Inc; 2004
3. Miura T, Grillo HC. The contribution of the inferior thyroid artery to the blood supply of the human trachea. Surg Gynecol Obstet. julio de 1966;123(1):99-102.
4. Salassa JR, Pearson BW, Payne WS. Gross and microscopical blood supply of the trachea. Ann Thorac Surg. agosto de 1977;24(2):100-7.
5. Ross M, Kaye G, Wojciech, P. Histologia. Texto y Alas Color con Biología Molecular y Celular. Buenos Aires: Panamericana; 2006.
6. Epstein SK. Anatomy and physiology of tracheostomy. Respir Care. abril de 2005;50(4):476-82.
7. Kandjov IM. Heat and water rate transfer processes in the human respiratory tract at various altitudes. J Theor Biol. febrero de 2001;208(3):287-93.
8. Finkbeiner WE. Physiology and pathology of tracheobronchial glands. Respir Physiol. 1 de diciembre de 1999;118(2-3):77-83.
9. Van der Schans CP. Bronchial mucus transport. Respir Care. septiembre de 2007;52(9):1150-1156; discussion 1156-1158.
10. Polverino M, Polverino F, Fasolino M, Andò F, Alfieri A, De Blasio F. Anatomy and neuro-pathophysiology of the cough reflex arc. Multidiscip Respir Med. 18 de junio de 2012;7(1):5.
11. Lorenz RR. Adult laryngotracheal stenosis: Etiology and surgical management. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2003;11:467–72.
12. Damrose EJ. On the development of idiopathic subglottic stenosis. Med Hypotheses. 2008;71:122–5.
13. Valdez TA, Shapshay SM. Idiopathic subglottic stenosis revisited. Ann Otol Rhino Laryngol. 2002;111:690–5.
14. Dedo HH, Catten MD. Idiopathic progressive subglottic stenosis: Findings and treatment in 52 patients. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2001;110:305–11.

15. Grillo HC, Mark EJ, Mathisen DJ, et al. Idiopathic laryngotracheal stenosis and its management. *Ann Thorac Surg* 1993; 56:80-87.
16. Ashiku SK, Kuzucu A, Grillo HC, et al. Idiopathic laryngotracheal stenosis: Effective definitive treatment with laryngotracheal resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 99-107.
17. Maronian NC, Azadeh H, Waugh P. Association of laryngopharyngeal reflux disease and subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001;110:606–12.
18. Terra RM, de Medeiros IL, Minamoto H. Idiopathic tracheal stenosis: Successful outcome with antigastroesophageal reflux disease therapy. *Ann Thorac Surg.* 2008;85:1438–9.
19. Grillo HC, Donahue DM, Mathisen DJ, Wain JC, Wright CD. Postintubation tracheal stenosis. Treatment and results. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109:486–92.
20. Nouraei SA, Ma E, Patel A, Howard DJ, Sandhu GS. Estimating the population incidence of adult post-intubation laryngotracheal stenosis. *Clin Otolaryngol.* 2007;32:411–2.
21. Weymuller EA. Laryngeal injury from prolonged endotracheal intubation. *Laryngoscope.* 1988;98:1–15.
22. Wain JC. Postintubation tracheal stenosis. *Chest Surg Clin N Am.* 2003;13:231–46.
23. McCaffrey TV. Classification of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope.* 1992;102:1335–40.
24. Koshkareva Y, Gaughan JP, Soliman AM. Risk factors for adult laryngotracheal stenosis: a review of 74 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007;116:206–10.
25. Cooper JD .Tracheal Injuries Complicating Prolonged Intubation and Tracheostomy. *Thorac Surg Clin.* 2018 May;28(2):139-144. doi: 10.1016/j.thorsurg.2018.01.001.
26. Melloni G, Muttini S, Gallioli G, et al. Surgical tracheostomy versus percutaneous tracheostomy. A prospective-randomized study with long-term follow up. *J Cardiovasc Surg* 2002;43:113–21.

27. Wagner F, Nasser R, Laucke U, et al. Percutaneous dilatational tracheostomy: results and long-term outcome of critically ill patients following cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998;46:352–6.
28. Sue RD, Susanto I. Long term complications of artificial airways. *Clin Chest Med* 2003;24:457–71.
29. Gillmore JD, Hawkins PN. Amyloidosis and the respiratory tract. *Thorax*. 1999;54:444–51.
30. O'Reagan A, Fenlon HM, Beamis JF, Steele MP, Skinner M, Berk JL. Tracheobronchial amyloidosis. The Boston University experience from 1984 to 1999. *Medicine (Baltimore)*. 2000;79:69–79. 24
31. Polychronopoulos VS, Prakash USB. Airway involvement in sarcoidosis. *Chest*. 2009;136:1371–80.
32. Udwadia ZF, Pilling JR, Jenkins PF. Bronchoscopic and bronchographic findings in 12 patients with sarcoidosis and severe or progressive airways obstructions. *Thorax*. 1990;45:272–5.
33. Chambellan A, Turbie P, Nunes H. Endoluminal stenosis of proximal bronchi in sarcoidosis: Bronchoscopy, function and evolution. *Chest*. 2005;127:472–81
34. Baughman RP, Lower EE, Tami T. Upper airway: Sarcoidosis of the upper airway respiratory tract (SURT). *Thorax*. 2010;65:181–6.
35. Brandstetter RD, Messina MS, Sprince NL. Tracheal stenosis due to sarcoidosis. *Chest*. 1981;80:656.
36. Lahmer T, Treiber M, von Werder A. Relapsing polychondritis: An autoimmune disease with many faces. *Autoimmun Rev*. 2010;9:540–6.
37. Rafeq S, Trentham D, Ernst A. Pulmonary manifestations of relapsing polychondritis. *Clin Chest Med*. 2010;31:513–8.
38. Grenier PA, Beigelman-Aubry C, Brillet PY. Nonneoplastic tracheal and bronchial stenosis. *Radiol Clin North Am*. 2009;47:243–60.
39. Daum TE, Specks U, Colby TV, Edell ES, Brutinel MW, Prakash UB. Tracheobronchial involvement in Wegener's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:522–6
40. Gluth MB, Shinnars PA, Kasperbauer JL. Subglottic stenosis associated with Wegener's granulomatosis. *Laryngoscope*. 2003;113:1304–7.

41. Lebovics RS, Hoffman GS, Leavitt RY, Kerr GS, Travis WD, Kammerer W. The management of subglottic stenosis in patients with Wegener's granulomatosis. *Laryngoscope*. 1992;102:1341–5.
42. Alaani A, Hogg RP, Drake Lee AB. Wegener's granulomatosis and subglottic stenosis: Management of the airway. *J Laryngol Otol*. 2004;118:786–90.
43. McCallister JW, Bowling M, Chin R, Conforti J, Haponik E. Bronchoscopy in the diagnosis of Wegener granulomatosis. *Clin Pulm Med*. 2007;14:179–82.
44. Hervier B, Pagnoux C, Renaudin K, Masseau A, Pottier P, Planchon B, Guillevin L, Hamidou M. [Endobronchial stenosis in Wegener's Granulomatosis. *Rev Med Interne*. 2006 Jun;27(6):453-7. Epub 2006 Apr 5.
45. Summers RM, Aggarwal NR, Sneller MC, Cowan MJ, Wood BJ, Langford CA. CT virtual bronchoscopy of the central airways in patients with Wegener's granulomatosis. *Chest*. 2002;121:242–50.
46. Polychronopoulos VS, Prakash UB, Golbin JM, Edell ES, Specks U. Airway involvement in Wegener's granulomatosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2007;33:755–75.
47. Screatton NJ, Sivasothy P, Flower CD, Lockwood CM. Tracheal involvement in Wegener's granulomatosis: Evaluation using spiral CT. *Clin Radiol*. 1998;53:809–15.
48. McDonald TJ, Neel HB, DeRemee RA. Wegener's granulomatosis of the subglottic and upper portion of the trachea. *Ann Otol Rhino Laryngol*. 1982;91:588–92.
49. Langford CA, Sneller MC, Hallahan CW, Hoffman GS, Kammerer WA, Talar-Williams C, et al. Clinical features and therapeutic management of subglottic stenosis in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*. 1996;39:1754–60.
50. Smith LS, Schillaci RF, Sarlin RF. Endobronchial tuberculosis: Serial fiberoptic bronchoscopy. *Chest*. 1987;91:644–7.
51. Hudson EH. Respiratory tuberculosis: clinical diagnosis. En: Heaf ERG, editor. *Symposium on tuberculosis*. London: Cassel and Co; 1957. p. 321–464.
52. Kashyap S, Mohapatra PR, Saini V. Endobronchial tuberculosis. *Indian J Chest Dis Allied Sci*. 2003;45:247–56.



53. Park MJ, Woo IS, Son JW. Endobronchial tuberculosis with expectoration of tracheal cartilages. *Eur Respir J*. 2000;15:800–2.
54. Chung HS, Lee JH. Bronchoscopic assessment of the evolution of endobronchial tuberculosis. *Chest*. 2000;117:385–92.
55. Lee JH, Park SS, Lee DH, Yang SC, Yoo BM. Endobronchial tuberculosis: Clinical and bronchoscopic features in 121 cases. *Chest*. 1992;102:990–4
56. Leske V, Lazor R, Coetmeur D. Tracheobronchopathia osteochondroplastica: A study of 41 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80:378–90.
57. Abu-Hijleh M, Lee D, Braman SS. Tracheobronchopathia osteochondroplastica: A rare large airway disorder. *Lung*. 2008;186:353–9.
58. Restrepo S, Pandit M, Villamil MA. Tracheobronchopathia osteochondroplastica: Helical CT findings in 4 cases. *J Thorac Imaging*. 2004;19:112–6.
59. Nienhuis DM, Prakash UB, Edell ES. Tracheobronchopathia osteochondroplastica. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990;99:689–94.
60. Zack JR, Rozenshtein A. Tracheobronchopathia osteochondroplastica: Report of 3 cases. *J Comput Assist Tomogr*. 2002;26:33–6.
61. Tajima K, Yamakawa M, Katagiri T. Immunohistochemical detection of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor B1 in tracheobronchopathia osteochondroplastica. *Virchows Archiv*. 1997;431:359–63.
62. Jabbardarjani HR, Radpey B, Kharabian S. Tracheobronchopathia osteochondroplastica: Presentation of ten cases and review of the literature. *Lung*. 2008;186:293–7.
63. Hayes Jr D. Tracheopathia osteoplastica misdiagnosed as asthma. *J Asthma*. 2007;44:253–5.
64. Piao M, Yuan Y, Wang Y, Feng C. Successful management of trachea stenosis with massive substernal goiter via thacheobronchial stent.. *J Cardiothorac Surg*. 2013 Nov 15;8:212
65. Hua Q et al. Tracheal Compression Caused by a Mediastinal Hematoma After Interrupted Aortic Arch Surgery. *Int Heart J*. (2017)

66. Langenbach J, Stiller B, Kroll J, Grohmann J. Bilateral Arterial Ducts Causing Airway Compression by a Vascular Ring. *Ann Thorac Surg*. 2018 Feb;105(2):e89.
67. Gandhi H, Naidu TVK, Mishra A, Garg P, Surti J, Trivedi V, Acharya H. Management of a case of double aortic arch with tracheal compression complicated with postoperative tracheal restenosis. *Ann Card Anaesth*. 2017 Jul-Sep;20(3):362-364.
68. Barbara DW, Broski SM, Patch RK, Pochettino A. Double Aortic Arch Causing Severe Tracheal Compression. *Anesthesiology*. 2017 Feb;126(2):326.
69. Rollin M, Jaulim A, Vaz F, Sandhu G, Wood S, Birchall M, Dawas K. Caustic ingestion injury of the upper aerodigestive tract in adults. *Ann R Coll Surg Engl*. 2015 May;97(4):304-7
70. Yang JY, Yang WG, Chang LY, Chuang SS. Symptomatic tracheal stenosis in burns. *Burns*. 1999 Feb;25(1):72-80.
71. Rodríguez H, Cuestas G, Botto H, Cocciaglia A, Nieto M, Zanetta A. Estenosis subglótica postintubación en niños. Diagnóstico, tratamiento y prevención de las estenosis moderadas y severas. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2013;64:339- 44
72. Barbancho DC, Antón-Pacheco J, Diaz ML, Sánchez RT, García JC, Fraile AG. Acquired tracheal stenosis: diagnosis and treatment. *Cir Pediatr*. 2007 Jan;20(1):19-24. Spanish. PubMed PMID: 17489488.
73. Myer CM, O'Connor DM, Cotton RT. Proposed grading system for subglottic stenosis based on endotracheal tube sizes. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1994;103(4 Pt 1):319- 23.
74. Manica D, Schweiger C, Maróstica PJ, Kuhl G, Carvalho PR. Association between length of intubation and subglottic stenosis in children. *Laryngoscope*. 2013;123:1049-54
75. Quesnel AM, Lee GS, Nuss RC, Volk MS, Jones DT, Rahbar R. Minimally invasive endoscopic management of subglottic stenosis in children: success and failure. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011;75:652-6
76. Duynstee ML, de Krijger RR, Monnier P, Verwoerd CD, Verwoerd-Verhoef HL. Subglottic stenosis after endolaryngeal intubation in infants and children: result of wound healing processes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2002;62:1-9

77. Hautefort C, Teissier N, Viala P, Van Den Abbeele T. Balloon dilation laryngoplasty for subglottic stenosis in children: eight years' experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;138:235-40.
78. Smith ME, Elstad M. Mitomycin C and the endoscopic treatment of laryngotracheal stenosis: are two applications better than one? *Laryngoscope.* 2009 Feb ;119(2):272-83.
79. Monnier P, George M, Monod M-L, Lang F. The role of the CO2 laser in the management of laryngotracheal stenosis: a survey of 100 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005 Aug;262(8):602-8
80. Cotton RT, Myer CM. Contemporary surgical management of laryngeal stenosis in children. *Am J Otolaryngol* 1984;5(5):360-8.
81. Gustafson LM, Hartley BE, Liu JH, Link DT, Chadwell J, Koebbe C, et al. Single-stage laryngotracheal reconstruction in children: a review of 200 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000 Oct;123(4):430-4
82. Saunders MW, Thirlwall a, Jacob a, Albert DM. Single-or-two-stage laryngotracheal reconstruction; comparison of outcomes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1999 Oct 15;50(1):51-4
83. Padia R, Sjogren P, Smith M, Muntz H, Stoddard G, Meier J. Systematic review/meta-analysis comparing successful outcomes after single vs. double-stage laryngotracheal reconstruction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2018 May;108:168-174.
84. Grillo HC. Congenital and acquired tracheal lesions in children. In: Grillo HC, editor. *Surgery of the trachea and bronchi.* Hamilton: DB Decker Inc; 2004. p. 173-207
85. Matute JA, Anton-Pacheco JL, Berchi FJ, Vilariño A. Lesiones estructurales obstructivas traqueobronquiales. In: Valoria JM, editor. *Cirugía Pediatría.* Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1994. p. 796-806.
86. Sánchez I, Navarro H, Méndez M, Holmgren N, Caussade S: Clinical characteristics of children with tracheobronchial anomalies. *Pediatr Pulmonol* 2003; 35: 288-391.
87. Antón-Pacheco JL, Cano I, García A, et al. Patterns of management of congenital tracheal stenosis. *J Pediatr Surg.* 2003;38:1452-1458.

88. Cantrell JR, Guild HG. Congenital stenosis of the trachea. *Am J Surg.* 1964;108: 297–305.
89. Elliott M, Roebuck D, Noctor C, et al. The management of congenital tracheal stenosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003;67:183–192.
90. Speggorin S, Torre M, Roebuck DJ, et al. A new morphologic classification of congenital tracheobronchial stenosis. *Ann Thorac Surg.* 2012;93:958–961
91. Okamoto T, Nishijima E, Maruo A, et al. The Congenital tracheal stenosis: the prognostic significance of associated cardiovascular anomalies and the optimal timing of surgical treatment. *J Pediatr Surg.* 2009;44:325–328.
92. Sade RM, Rosenthal A, Fellows K, et al. Pulmonary artery sling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975;69:333-46.
93. Antón-Pacheco JL, García G, Villafruela MA. The management of tracheobronchial obstruction in children. *Minerva Pediatr.* 2009;61:39–52.
94. Antón-Pacheco J.L. et al. Management of congenital tracheal stenosis in infancy. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 29 (2006) 991—996
95. Tsan V, Murday A, Gillbe C, Goldstraw P y cols. Slide tracheoplasty for congenital funnel-shaped tracheal stenosis. *Ann Thorac Surg* 1989;48:632-35
96. Backer CL, Mavroudis C, Gerber ME y cols. Tracheal surgery in children: an 18-year review of four techniques. *Eur J Cardiothorac Surg* 201;19:777-84
97. Matute de Cardenas JA. Avances en cirugía laringotraqueal. *Cir Pediatr.* 2001;14:47-52.
98. Andres Martín A, Pineda Mantecon M. Aportación de la fibrobroncoscopia pediátrica al diagnóstico de la patología respiratoria alta en el niño. *Neumosur.* 2000;12:110–9.
99. Houel R, Serraf A, Macchiarini P, Bruniaux J, Planche C. Tracheoplasty in congenital tracheal stenosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1998;44:31 – 8.
100. Prado F, Varela P, Boza MI, Koppmann A. Estenosis subglótica adquirida: tres años de experiencia (1999–2001). *Rev Chil Enf Respir.* 2003;19:71–7.
101. Du Rand IA, Blaikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S, et al. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults. *Thorax* 2013; 68 Suppl 1: s1-44.
102. Bacon JL, Patterson CM, Madden BP. Indications and interventional options for non-resectable tracheal stenosis. *J Thorac Dis.* 2014;6:258-70.

103. Chao YK, Liu YH, Hsieh MJ, Wu YC, Liu HP, Wang CJ, et al. Controlling difficult airway by rigid bronchoscope- an old but effective method. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2005;4:175-9
104. Ferretti GR, Bricault I, Coulomb M. Helical CT with multiplanar and three-dimensional reconstruction of non-neoplastic abnormalities of the trachea. *J Comput Assist Tomogr.* 2001;25:400-6.
105. Finkelstein SE, Summers RM, Nguyen DM, Schrupp DS. Virtual bronchoscopy for evaluation of airway disease. *Thorac Surg Clin.* 2004;14:79-86.
106. Gluecker T, Lang F, Bessler S, Monnier P, Meuli R, Schnyder P, et al. 2D and 3D CT Imaging correlated to rigid endoscopy in complex laryngo-tracheal stenoses. *Eur Radiol.* 2001;11:50-4.
107. Koletsis EN, Kalogeropoulou C, Prodromaki E, Kagadis GC, Katsanos K, Spiropoulos K, et al. Tumoral and non-tumoral trachea stenoses: evaluation with three-dimensional CT and virtual bronchoscopy. *J Cardiothorac Surg.* 2007;2:18.
108. Callanan V, Gillmore K, Field S, Beaumont A. The use of magnetic resonance imaging to assess tracheal stenosis following percutaneous dilatational tracheostomy. *J Laryngol Otol.* 1997 Oct;111(10):953-7.
109. Sommburg O, Helling-Bakki A, Alrajab A, Schenk JP, Springer W5, Mall MA, Loukanov T, Eichhorn JG. Assessment of Suspected Vascular Rings and Slings and/or Airway Pathologies Using Magnetic Resonance Imaging Rather Than Computed Tomography. *Respiration.* 2019;97(2):108-118. doi: 10.1159/000492080. Epub 2018 Oct 5.
110. Shepard JO1, Flores EJ1, Abbott GF1 Imaging of the trachea. *Ann Cardiothorac Surg.* 2018 Mar;7(2):197-209. doi: 10.21037/acs.2018.03.09.
111. Breisinger A, Laszig R, Matthys H. Gustav Killian Memorial Lecture. 100 years bronchoscopy--early history and subsequent development. *Pneumologie,* 1997 Jul;51(7):611-9.
112. Colt HG. Rigid bronchoscopy: History and current instrumentation. *UpToDate.* en: [http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=int\\_pulm/4984&selectedTitle=14%7E19&source=search\\_result](http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=int_pulm/4984&selectedTitle=14%7E19&source=search_result)
113. Boyd AD. Chevalier Jackson: the father of American bronchoesophagology. *Ann Thorac Surg,* 1994;57(2):502-5.

114. Jackson, C. Bronchoscopy: past, present and future. *N Engl J Med* 1928; 199-758.
115. Suárez López de Vergara R. G. Orígenes de la fibrobroncoscopía. ¿Cómo se desarrolló en nuestro medio?. *BSCP Can Ped* 2004; 28 (1): 19-22.
116. Sauret Valet J. Cien años de Neumología. Madrid: Aula Médica S. A; 1998
117. Ikeda S, Yanai N, Ishikawa S. Flexible bronchofiberscope. *Keio J Med*. 1968 Mar;17(1):1-16.
118. Personne C, Colchen A, Leroy M, Vourc'h G, Toty L. Indications and technique for endoscopic laser resections in bronchology. A critical analysis based upon 2,284 resections. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1986 May;91(5):710-5
119. Bolliger CT, Mathur PN, Beamis JF, et al. ERS/ATS statement on interventional pulmonology. European Respiratory Society/American Thoracic Society. *Eur Respir J* 2002; 19:356.
120. Ernst A, Silvestri GA, Johnstone D, American College of Chest Physicians. Interventional pulmonary procedures: Guidelines from the American College of Chest Physicians. *Chest* 2003; 123:1693.
121. Ernst A, Feller-Kopman D, Becker HD, Mehta AC. Central airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:1278.
122. Mehta AC, Harris RJ, De Boer GE. Endoscopic management of benign airway stenosis. *Clin Chest Med* 1995; 16:401.
123. Dumon JF. YAG Laser bronchoscopy, Praeger Publishers, New York 1985. p.117.
124. Mayse ML, Greenheck J, Friedman M, Kovitz KL. Successful bronchoscopic balloon dilation of nonmalignant tracheobronchial obstruction without fluoroscopy. *Chest* 2004; 126:634.
125. Hautmann H, Gamarra F, Pfeifer KJ, Huber RM. Fiberoptic bronchoscopic balloon dilatation in malignant tracheobronchial disease: indications and results. *Chest* 2001; 120:43.
126. Noppen M, Schlessen M, Meysman M, et al. Bronchoscopic balloon dilatation in the combined management of postintubation stenosis of the trachea in adults. *Chest* 1997; 112:1136.
127. Girard P, Baldeyrou P, Lemoine G, Grunewald D. Left main-stem bronchial stenosis complicating bronchial artery embolization. *Chest* 1990; 97:1246.

128. Ball JB, Delaney JC, Evans CC, et al. Endoscopic bougie and balloon dilatation of multiple bronchial stenoses: 10 year follow up. *Thorax* 1991; 46:933.
129. Carré P, Rousseau H, Lombart L, et al. Balloon dilatation and self-expanding metal Wallstent insertion. For management of bronchostenosis following lung transplantation. The Toulouse Lung Transplantation Group. *Chest* 1994; 105:343.
130. Fouty BW, Pomeranz M, Thigpen TP, Martin RJ. Dilatation of bronchial stenoses due to sarcoidosis using a flexible fiberoptic bronchoscope. *Chest* 1994; 106:677.
131. Ferretti G, Jouvan FB, Thony F, et al. Benign noninflammatory bronchial stenosis: treatment with balloon dilation. *Radiology* 1995; 196:831.
132. Strychowsky JE, Roberson DW, Martin T, et al. Proximal bronchial balloon dilation for embedded distal airway foreign bodies. *Laryngoscope* 2016; 126:1693.
133. Tanahashi M, Niwa H, Yukiue H et al. Global perspectives on bronchoscopy. Bronchoscopic balloon dilation for benign tracheobronchial stenosis. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com) (Accessed on May 26, 2015). Lee KH, Ko GY, Song HY, et al. Benign tracheobronchial stenoses: long-term clinical experience with balloon dilation. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13:909.
134. Lee KH, Ko GY, Song HY, et al. Benign tracheobronchial stenoses: long-term clinical experience with balloon dilation. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13:909.
135. Kim JH, Shin JH, Song HY, et al. Tracheobronchial laceration after balloon dilation for benign strictures: incidence and clinical significance. *Chest* 2007; 131:1114.
136. Kim JH, Shin JH, Shim TS, et al. Deep tracheal laceration after balloon dilation for benign tracheobronchial stenosis: case reports of two patients. *Br J Radiol* 2006; 79:529.
137. Zakaluzny SA, Lane JD, Mair EA. Complications of tracheobronchial airway stents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 128:478.
138. Burningham AR, Wax MK, Andersen PE, et al. Metallic tracheal stents: complications associated with long-term use in the upper airway. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111:285.

139. Nashef SA, Dromer C, Velly JF, et al. Expanding wire stents in benign tracheobronchial disease: indications and complications. *Ann Thorac Surg* 1992; 54:937-940.
140. Dooms C, De Keukeleire T, Janssens A, Carron K. Performance of fully covered self-expanding metallic stents in benign airway strictures. *Respiration* 2009; 77:420.
141. Antón-Pacheco JL. Tracheobronchial stents in children. *Semin Pediatr Surg*. 2016 Jun;25(3):179-85. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2016.02.011. Epub 2016 Feb 22. Review. PubMed PMID: 27301605.
142. Dineen KM, Jantz MA, Silvestri GA. Tracheobronchial stents. *J Bronchol* 2002; 9: 127- 137.
143. Antón-Pacheco JL, Cabezalí D, Tejedor R, López M, Luna C, Comas JV, de Miguel E. The role of airway stenting in pediatric tracheobronchial obstruction. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Jun;33(6):1069-75. doi: 10.1016/j.ejcts.2008.01.034. Epub 2008 Mar 4. PubMed PMID: 18299200.
144. Madden BP, Park JE, Sheth A. Medium-term follow-up after deployment of ultraflex expandable metallic stents to manage endobronchial pathology. *Ann Thorac Surg*. 2004 Dec;78(6):1898-902.
145. Madden BP, Park JE, Sheth A. Montgomery WW. T-Tube tracheal stent. *Arch Otolaryngol* 1965; 82: 320-321.
146. Prasanna Kumar S<sup>1</sup>, Ravikumar A<sup>2</sup>, Senthil K<sup>3</sup>, Somu L<sup>4</sup>, Nazrin MI<sup>5</sup>. Role of Montgomery T-tube stent for laryngotracheal stenosis. *Auris Nasus Larynx*. 2014 Apr;41(2):195-200. doi: 10.1016/j.anl.2013.10.008. Epub 2013 Oct 27.
147. Carretta A, Casiraghi M, Melloni G, Bandiera A, Ciriaco P, Ferla L, Puglisi A, Zannini P. Montgomery T-tube placement in the treatment of benign tracheal lesions. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009 Aug;36(2):352-6; discussion 356. doi: 10.1016/j.ejcts.2009.02.049. Epub 2009 Apr 11.
148. Dumon JF. A dedicate tracheobronchial stent. *Chest* 1990; 97:328-332.
149. Giudicelli R, Dumon JF, Meric B, et al. Les sténoses trachéales inflammatoires. Attitude thérapeutique et résultats. *Ann Chir* 1987; 41:491-493.
150. Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, et al. Use of silicone stents in the management of airway problems. *Ann Thorac Surg* 1989; 47:371.



151. Dumon JF, Díaz-Jiménez JP et al. Seven year experience with the dumon prothesis. *J Bronchol* 1996; 3: 6-10.
152. Bollinger C, Probst R, TcshoppK et al. Silicone stent in the management of inoperable tracheobronchial stenoses: indications and limitations. *Chest* 1993; 104: 1653-1659.
153. Martinez-Ballarín JI, Díaz-Jiménez JP, Castro MJ et al. Silicone stents in the management of benign stenoses. Tolerance and early results in 63 patients. *Chest* 1996; 109: 626-629.
154. Fuehner T, Suhling H, Greer M, et al. Biodegradable stents after lung transplantation. *Transpl Int* 2013; 26:e58.
155. Stehlik L, Hytych V, Letackova J, et al. Biodegradable polydioxanone stents in the treatment of adult patients with tracheal narrowing. *BMC Pulm Med* 2015; 15:164.
156. Antón-Pacheco JL, Luna C, García E, et al. Initial experience with a new biodegradable airway stent in children: Is this the stent we were waiting for? *Pediatr Pulmonol* 2016; 51:607.
157. Sztanó B, Kiss G, Márai K, et al. Biodegradable airway stents in infants - Potential life-threatening pitfalls. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2016; 91:86.
158. Kong Y, Zhang J, Wang T, et al. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded poly lactic acid-co-glycolic acid coating tracheal stent. *Chin Med J (Engl)* 2014; 127:2236.
159. Wang T, Zhang J, Wang J, et al. Paclitaxel Drug-eluting Tracheal Stent Could Reduce Granulation Tissue Formation in a Canine Model. *Chin Med J (Engl)* 2016; 129:2708.
160. Ranu H, Madden BP. Endobronchial stenting in the management of large airway pathology. *Postgrad Med J* 2009; 85:682.
161. Murgu SD, Colt HG. Complications of silicone stent insertion in patients with expiratory central airway collapse. *Ann Thorac Surg* 2007; 84:1870.
162. Ernst A, Majid A, Feller-Kopman D, et al. Airway stabilization with silicone stents for treating adult tracheobronchomalacia: a prospective observational study. *Chest* 2007; 132:609.

163. Dasgupta A, Dolmatch BL, Abi-Saleh WJ et al. Self-expandable metallic airway stent insertion employing flexible bronchoscopy: preliminary results. *Chest* 1998; 114: 106-109.
164. Tsang V, Goldstraw P. Self-expanding metal stent for tracheobronchial strictures. *Eur J Cardiothorac Surg* 1992; 6: 555-559.
165. Brichon Py, Blanc-Jouvan F, Rousseau H et al. Endovascular stents for tracheobronchial estenosis after lung transplantation. *Transplant Proc* 1992; 24: 2656-2659.
166. de Souza AC, Keal R, Hudson NM, et al. Use of expandable wire stents for malignant airway obstruction. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:1573.
167. George PJ, Irving JD, Khaghani A, Dick R. Role of the Gianturco expandable metal stent in the management of tracheobronchial obstruction. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1992; 15:375.
168. Food and Drug Administration. FDA public health notification: complications from metallic tracheal stents in patients with benign airway disorders, 2005 [www.fda.gov/cdrh/safety/072905-tracheal.html](http://www.fda.gov/cdrh/safety/072905-tracheal.html) (Accessed on January 15, 2007).
169. Rodriguez A, Diaz Jimenez J, Edell E. Silicone stent vs metal stents for the management of benign tracheobronchial disease. *J bronchol* 2000; 7: 184-187.
170. Dacic Y, Khalafi RS. Use of endoscopically placed expandable nitinol tracheal stents in treatment of tracheal stenosis. *Laryngoscope* 1999; 109: 1130-1133.
171. Wasserman K, Koch A, Muller-Ehmsen J et al. Clinical and laboratory evaluation of a new thin-walled self-expanding tracheobronchial silicone stent: progress and pitfalls. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114: 527-534
172. Jantz M, Silvestri GA. Silicone stents versus metal stents for management of benign tracheobronchial disease- pro metal stents. *J Bronchol* 2000; 7: 177-183.
173. Díaz Jiménez JP, Rodríguez A. Broncoscopia láser. En: Díaz Jiménez JP, Rodríguez A. *Neumología intervencionista*. Barcelona: Gea; 2000. p. 31-34.
174. Boulnois JL. Photophysical processes in recent medical laser development: a review. *Lasers med Sci* 1986; 1: 47-66.
175. Dixon J. *Surgical application of lasers*. 2º ed. Chicago: Year book Medical Publisher Inc; 1987.

176. Walsh JT, Jr., TJ F, Anderson RR et al. Pulsed Co2 láser tissue ablation: effect of tissue type and pulse duration on tissue damage. *Laser Surg Med* 1988; 8: 108-118.
177. Dumon JF, Reboud E, Garbe L, Aumonte F, Merris B. Treatment of tracheobronchial lesions by laser photoresection. *Chest* 1982; 81: 278-284.
178. Colt HG. Bronchoscopic laser resection. UpToDate [en línea] 2010 Enero [fecha de acceso 19 de mayo de 2010]. URL disponible en: [http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=int\\_pulm/5211&view=print](http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=int_pulm/5211&view=print)
179. Díaz Jiménez JP. Fotorresección con láser en patología traqueobronquial. *Med Clin (Barc)* 1989; 92:708-715.
180. Gaer JAR, Tsang V, Khaghani A, et al. Use of endotracheal silicone stents for relief of tracheobronchial obstruction. *Ann Thorac Surg* 1992; 54:512-516.
181. LaForet EG, Berger RL, Vaughan CW. Carcinoma obstructing the trachea: treatment by laser resection. *N Engl J Med* 1976; 294:941.
182. Boxem Tv, Muller M, Venmans B, et al. Nd-YAG laser vs bronchoscopic electrocautery for palliation of symptomatic airway obstruction: a cost-effectiveness study. *Chest* 1999; 116:1108.
183. Rameau A, Zur KB. KTP laser ablation of extensive tracheal hemangiomas. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011 Sep;75(9):1200-3. doi: 10.1016/j.ijporl.2011.05.016. Epub 2011 Jul 20.
184. Sachdeva A1, Pickering EM1, Lee HJ1. From electrocautery, balloon dilatation, neodymium-doped: yttrium-aluminum-garnet (Nd:YAG) laser to argon plasma coagulation and cryotherapy. *J Thorac Dis.* 2015 Dec;7(Suppl 4):S363-79. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.12.12.
185. Bajaj Y1, Pegg D, Gunasekaran S, Knight LC Diode laser for paediatric airway procedures: a useful tool. *Int J Clin Pract.* 2010 Jan;64(1):51-4. doi: 10.1111/j.1742-1241.2008.01734.x. Epub 2008 Apr 14.
186. Cavaliere F and Dumon JF. Laser bronchoscopy. In: *Interventional bronchoscopy*, Bollinger CT, Mathur PN (Eds), Karger AG, Basel, Switzerland 2000. p.108.
187. Vanderschueren RG1, Westermann CJ. Complications of endobronchial neodymium-Yag (Nd:Yag) laser application. *Lung.* 1990;168 Suppl:1089-94.

188. Cavaliere S, Foccoli P, Farina PL. Nd:YAG laser bronchoscopy. A five-year experience with 1,396 applications in 1,000 patients. *Chest*. 1988 Jul;94(1):15-21.
- Beamis JF, Vergos K, Rebeiz EE, Shapsshay SM. Endoscopic laser therapy for obstructing tracheobronchial lesions. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 1991; 100: 413-419.
189. Beamis JF, Vergos K, Rebeiz EE, Shapsshay SM. Endoscopic laser therapy for obstructing tracheobronchial lesions. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 1991; 100: 413-419.
190. Peachey T, Eason J, Moxham D et al. Systemic air embolism during laser bronchoscopic. *Anesthesia* 1988; 43: 872-875.
191. Ross DJ, Mohsenitor Z, Po Hun RT et al. Pathogenesis of cerebral air embolism during NDYAG laser photoresection. *Chest* 1988; 94: 660-662.
192. Sliney DH. Laser safety. *Lasers Surg Med*. 1995;16(3):215-25.
193. Airway fires: reducing the risk during laser surgery. *Health Devices*. 1990 Apr;19(4):109-39.
194. Tellides G, Ugurlu BS, Kim RW, Hammond GL. Pathogenesis of systemic air embolism during bronchoscopic Nd:YAG laser operations. *Ann Thorac Surg* 1998; 65:930.
195. Miro AM, Ivarani U, Fuch PJ. Noncardiogenic pulmonary edema following laser therapy o tracheal neoplasm. *Chest* 1989; 96: 1430-1431.
196. Miks VM, Kavale PA, Riddle JM et al. Bronchiolith removal using the ND-Yag laser. *Chest* 1996; 90: 295-297.
197. Colice GL (1994) Historical background. In: Tobin MJ (ed) *Principles and practice of mechanical ventilation*. Mc-Graw Hill, New York, pp 1-37.
198. Grillo HC. Development of tracheal surgery: a historical review. Part 1: techniques of tracheal surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;75:610–9.
199. Eavey RD (1998) The history of tracheotomy. In: Myers EN, Johnson J, Murry T (eds) *Tracheotomy: airway management, communication and swallowing*. Singular, San Diego, pp 1-8.
200. Schüller M. Heilungsprozess der Trachealwunde. *Deutsch Chir* 1880;37:96–100

201. Glück T, Zeller A. Die prophylactische Resektion der trachea. Arch Klin Chir 1881;26:427–36.)
202. Küster E. Über narbige Stenosen der Trachea. Zentralbl Chir 1886;13:759–60.
203. Barclay RS, McSwan N, Welsh TM. Tracheal reconstruction without the use of grafts. Thorax. 1957;12:177-80 .
204. Ogura JH, Powers WE. Functional restitution of traumatic stenosis of the larynx and pharynx. Laryngoscope. 1964;74:1081.
205. Grillo HC. Primary reconstruction of airway after resection of subglottic laryngeal and upper tracheal stenosis. Ann Thorac Surg 1982; 33: 3–18.
206. Pearson FG, Cooper JD, Nelems JM, Van Nostrand AW. Primary tracheal anastomosis after resection of the cricoid cartilage with preservation of recurrent laryngeal nerves. J Thorac Cardiovasc Surg 1975; 70: 806–816.
207. Maddaus MA, Toth JL, Gullane PJ, Pearson FG. Subglottic tracheal resection and synchronous laryngeal reconstruction. J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 104: 1443– 1450.
208. Couraud L, Jougon JB, Ballester M. Techniques of management of subglottic stenoses with glottic and supraglottic problems. Chest Surg Clin N Am 1996; 6: 791– 809.
209. Morcillo Aixelá A, Wins Birabén R, Galán Gil G, Tarrazona Hervás V. Tratamiento quirúrgico de las estenosis gloto-subglóticas. En: Fernández Fau L, Freixinet Gilart J, editors. Tratado de Cirugía Torácica. Madrid: Editores Médicos; 2010. p. 741-55.
210. Cotton RT. Pediatric laryngotracheal stenosis. J Pediatr Surg. 1984;19: 699–704.
211. Grundfast KM, Morris MS, Bernsley C. Subglottic stenosis: retrospective analysis and proposal for standard reporting system. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1987;96:101–5.
212. Anand VK, Alemar G, Warren ET. Surgical considerations in tracheal stenosis. Laryngoscope. 1992;102:237–43.
213. Grillo HC, Donahue DM. Postintubation tracheal stenosis. Chest Surg Clin N Am 1996;6:725-31.

214. Freitag L, Ernst A, Unger M, Kovitz K, Marquette. A proposed classification system of central airway McCaffrey TV. Classification of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope*. 1992;102:1335-40.
215. Grillo HC, Mathisen DJ, Wain JC. Laryngotracheal resection and reconstruction for subglottic stenosis. *Ann Thorac Surg* 1992 Jan;53:54-63.
216. Broussard B, Mathisen DJ. Tracheal release maneuvers. *Ann Cardiothorac Surg*. 2018 Mar;7(2):293-298. doi: 10.21037/acs.2018.01.14.
217. Couraud L, Hafez A, Velly JF, Gironnet I. Current reconstructive management of subglottic stenosis of the larynx with reference to sixty consecutively treated cases. *Thorac Cardiovasc Surg* 1985 Oct;33:263- 7
218. Liberman M, Mathisen DJ. Treatment of idiopathic laryngotracheal stenosis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;21(3):278-83. Morcillo A, Wins R, Gómez-Caro A, Paradela M, Molins L, Tarrazona V. Single-staged laryngotracheal reconstruction for idiopathic tracheal stenosis. *Ann Thorac Surg*. 2013;95:433-9.
219. Morcillo A1, Wins R, Gómez-Caro A, Paradela M, Molins L, Tarrazona V. Single-staged laryngotracheal reconstruction for idiopathic tracheal stenosis. *Ann Thorac Surg*. 2013 Feb;95(2):433-9; discussion 439. doi: 10.1016/j.athoracsur.2012.09.093. Epub 2012 Dec 6.
220. Wrigth CD, Grillo HC, Wain JC, Wong DR, Donahue DM, Gaissert HA, Mathisen DJ. Anstomotic complications after tracheal resection: prognosis factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Nov;128(5):731-9
221. Amorós JM, Ramos R, Villalonga R, Morera R, Ferrer G, Díaz P Tracheal and cricotracheal resection for laryngotracheal stenosis: experience in 54 consecutive cases.. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 Jan;29(1):35-9. Epub 2005 Dec 6.
222. Donahue DM. Reoperative tracheal surgery. *Chest Surg Clin N Am* 2003;13:375-83
223. Bibas BJ, Terra RM, Oliveira Junior AL, Tamagno MF, Minamoto H, Pêgo-Fernandez PM. Predictors for postoperative complications after tracheal resection. *Ann Thorac Surg* 2014;98:277-82
224. Piazza C, Del Bon F, Paderno A, Grazioli P, Mangili S, Lombardi D, Nicolai P, Peretti G. Complications after tracheal and cricotracheal resection and

anastomosis for inflammatory and neoplastic stenoses. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2014;123:798-804.

225. Mutrie CJ, Eldaif SM, Rutlege CW, Force SD, Grist WJ, Mansour KA, Miller DL. Cervical tracheal resection: new lessons learned. *Ann Thorac Surg* 2011;91:1101-6

226. Leschber G. Management of trachea surgery complications. *Thorac Surg Clin* 2014;24:106-16.

227. Ciccone AM, De Giacomo T, Venuta F, Ibrahim M, Diso D, Coloni GF, Rendina EA. Operative and non-operative treatment of benign subglottic laryngotracheal stenosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:818-22.

228. Stock C, Gukasyan N, Muniappan A, et al. Hyperbaric oxygen therapy for the treatment of anastomotic complications after tracheal resection and reconstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;147:1030-5.

229. Allan JS, Wright CD. Tracheoinnominate fistula: diagnosis and management. *Chest Surg Clin N Am.* 2003 May;13(2):331-41.

230. Lofgren RH. Laryngologic problems related to trachea and bronchi. In: Grillo HC, editor. *Surgery of the trachea and bronchi*. Hamilton: DB Decker Inc; 2004. p. 693-706.

231. Sihag S, Wright CD. Prevention and Management of Complications Following Tracheal Resection. *Thorac Surg Clin.* 2015 Nov;25(4):499-508.

232. Pearson FG, Brito-Filomeno L, Cooper JD. Experience with partial cricoid resection and thyrotracheal anastomosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986;95(6 Pt1):582-5.

233. Lips M, Speyer R, Zumach A, Kross KW<sup>1</sup>, Kremer B. Supracricoid laryngectomy and dysphagia: A systematic literature review. *Laryngoscope.* 2015 Sep;125(9):2143-56. doi: 10.1002/lary.25341. Epub 2015 May 25.

234. Tschumperlin DJ, Shively JD, Kikuchi T, Drazen JM. Am J. Mechanical stress triggers selective release of fibrotic mediators from bronchial epithelium. *Respir Cell Mol Biol* 2003;28:142-9

235. Leask A, Abraham DJ, Fasseb J. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. 2004; 18: 816-27

236. Derynck R, Jarrett J, Chen E, Eaton D, Bell J, Assoian R, Roberts A, Sporn

- M, Goeddel D (1985). «Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells». *Nature* 316 (6030): 701-5
237. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342:1350-8.
238. Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, et al «TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex». *Cell* 71 (6): 1003-14.
239. Santiago B, Gutierrez-Cañás I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, Prieto J, Borrás F, Pablos JL. Topical application of a peptide inhibitor of TGF-1 ameliorates bleomycin induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 2005;125(3):450-5
240. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (December 1997). «TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins». *Nature* 390 (6659): 465-71. doi:10.1038/37284. PMID 9393997.
241. Attisano L, Wrana JL (April 1998). «Mads and Smads in TGF beta signalling». *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (2): 188-94. doi:10.1016/S0955-0674(98)80141-5. PMID 9561843.
242. Massagué J (1998). «TGF-beta signal transduction». *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-91. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.753. PMID 9759503.
243. Attisano L, Wrana JL (May 2002). «Signal transduction by the TGF-beta superfamily». *Science* 296 (5573): 1646-7. doi:10.1126/science.1071809. PMID 12040180.
244. Whitman M (August 1998). «Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily». *Genes Dev.* 12 (16): 2445-62. doi:10.1101/gad.12.16.2445. PMID 9716398.
245. Wrana JL (March 2000). «Crossing Smads». *Sci. STKE* 2000 (23): RE1. doi:10.1126/stke.2000.23.re1. PMID 11752591.
246. Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1964-78. Epub 2003/07/09.
247. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 2004;85(2):47-64. Epub 2004/05/25



248. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1998;1(4):611-7. Epub 1998/07/14.
249. The Smads. *Genome Biol* 2001;2(8):REVIEWS3010. Epub 2001 Aug 2.
250. Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC. The role of internalization in transforming growth factor beta1- induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells. *J Biol Chem* 2005;280(9):8300-8. Epub 2004/12/23.
251. Moustakas A. «Smad signalling network». *J. Cell. Sci.* 115 (Pt 17): 3355-6.
252. Souchelnytskyi S, Rönnstrand L, Heldin CH, ten Dijke P (2001). «Phosphorylation of Smad signaling proteins by receptor serine/threonine kinases». *Methods Mol. Biol.* 124: 107-20.
253. Kawabata M, Inoue H, Hanyu A, Imamura T, Miyazono K. Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J* 1998;17(14):4056-65. Epub 1998/07/22.
254. Inagaki Y, Truter S, Ramirez F. Transforming growth factor-beta stimulates alpha 2(I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem* 1994;269(20):14828-34. Epub 1994/05/20.
255. Bhattacharyya S, Ghosh AK, Pannu J, Mori Y, Takagawa S, Chen G, et al. Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1248-58. Epub 2005/04/09.
256. Wen FQ, Liu X, Manda W, Terasaki Y, Kobayashi T, Abe S, et al. TH2 cytokine-enhanced and TGF-beta-enhanced vascular endothelial growth factor production by cultured human airway smooth muscle cells is attenuated by IFN-gamma and corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1307-18.
257. Lee YC, Hung MH, Liu LY, Chang KT, Chou TY, Wang YC, et al. The role of transforming growth factor -1 and vascular endothelial growth factor in the tracheal granulation formation. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2011;24:23-31

258. Benke K, Ágg B, Szilveszter B, Tarr F, Nagy ZB, Pólos M, Daróczi L, Merkely B, Szabolcs Z. The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol J*. 2013;20(3):227-34.
259. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V<sup>4</sup>. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen*. 2016 Mar;24(2):215-22.
260. Majewski D, Majewska KA, Kuznar-Kaminska B, Runowska M, Piorunek T, Batura-Gabryel H, Puszczewicz M<sup>4</sup>. Systemic Sclerosis and Serum Content of Transforming Growth Factor. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1153:63-67.
261. Ravitz MJ, Wenner CE. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-b. *Adv Cancer Res* 1997;71:165-207.
262. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-*b* 1 knock out mice. *Development* 1995;121:1845-54.
263. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-*b* receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 1996;179:297-302.
264. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995;1:1623-34.
265. Travis MA, Sheppard D. TGF- $\beta$  activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:51-82.
266. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-*b*. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-61..
267. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
268. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF-b: From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Jun 1;9(6). pii: a022236. doi: 10.1101/cshperspect.a022236.
269. Villanueva A, Garcia C, Paules AB, et al. Disruption of the antiproliferative TGF-*b* signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1998;17:1969-78.

270. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor *b* receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 1999;59:320-4.
271. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF-*b* receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-8.
272. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, et al. A transforming growth factor *b* receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1995;55:5545-7.
273. Sun L, Wu G, Willson JK, et al. Expression of transforming growth factor *b* type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 1994;269:26449-55.
274. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-3.
275. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996;13:343-6.
276. Howe JR, Roth S, Ringold JC, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998;280:1086-8.
277. Ewen ME, Oliver CJ, Sluss HK, Miller SJ, Peeper DS. p53-Dependent repression of CDK4 translation in TGF-*b*-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes Dev* 1995;9:204-17.
278. Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M, Moses HL. Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor *b* 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3239-43.
279. Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, Wang XF. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor *b*-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 1997;17:2030-7.
280. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of TGF $\beta$ /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999; 13:804-16.
281. Vogel G. A new blocker for the TGF-*b* pathway. *Science* 1999;286:665.

282. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cáncerprogression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999;397:530-4.
283. Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman E. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor *b1*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:497-504.
284. T Virtanen A, Haikarainen T, Raivola J, Silvennoinen O. Selective JAKinibs: Prospects in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *BioDrugs*. 2019 Feb;33(1):15-32.
285. O'Shea J. JAK kinases in health and disease: an update. *Open Rheumatol J* 2012;6:232–44
286. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The janus kinases (jaks). *Genome Biol* 2004;5:253
287. S. Aittomaki, S. Pesu, M. Therapeutic Targeting of the JAK/STAT Pathway. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2014, 114, 18–23
288. Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 2000; 101:259-70
289. Lim WA, Pawson T. Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* 2010; 142:661-7
290. Matsui F, Meldrum KK The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease. *J Surg Res*. 2012 Nov;178(1):339-45.
291. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med* 2013;368:161–70.
292. Liongue, C. Ward, A.C. Evolution of the JAK-STAT pathwayJAK-STAT 2:1, e22756; January/February/March 2013; © 2013 Landes Bioscience
293. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*. 2001; 19:378.
294. Luo K. Signaling Cross Talk between TGF- $\beta$ /Smad and Other Signaling Pathways *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Jan; 9(1): a022137.
295. Xin P, Xu X, Deng C, Liu S, Wang Y, Zhou X, Ma H, Wei D, Sun S. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020 Mar;80:106210.

296. Bright JJ, Sriram S. 1998. TGF- $\beta$  inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol* 161: 1772–1777.
297. Pardoux C, Ma X, Gobert S, Pellegrini S, Mayeux P, Gay F, Trinchieri G, Chouaib S. 1999. Downregulation of interleukin-12 (IL-12) responsiveness in human T cells by transforming growth factor- $\beta$ : Relationship with IL-12 signaling. *Blood* 93: 1448–1455.
298. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- $\beta$ /BMP and other pathways *Cell Res*. 2009 January ; 19(1): 71–88.
299. Liu Y, Liu H, Meyer C, Li J, Nadalin S, Konigsrainer A, Weng H, Dooley S, ten Dijke P. 2013. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *J Biol Chem* 288: 30708–30719.
300. Wang X, Shaw S, Amiri F, Eaton DC, Marrero MB. Inhibition of the Jak/STAT signaling pathway prevents the high glucose-induced increase in tgf-beta and fibronectin synthesis in mesangial cells. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3505-9.
301. Huang M, Sharma S, Zhu LX, et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2002; 109:931–937.
302. Cocolakis E, Dai M, Drevet L, Ho J, Haines E, Ali S, Lebrun JJ. 2008. Smad signaling antagonizes STAT5-mediated gene transcription and mammary epithelial cell differentiation. *J Biol Chem* 283: 1293–1307.
303. Walia B, Wang L, Merlin D, Sitaraman SV. TGF-beta down-regulates IL-6 signaling in intestinal epithelial cells: critical role of SMAD-2. *FASEB J*. 2003; 17:2130–2132.
304. Jenkins BJ, Grail D, Nheu T, et al. Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. *Nat Med*. 2005; 11:845–852.
305. J.S. Fridman, P.A. Scherle, R. Collins, et al., Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050, *J. Immunol*. 184 (2010) 5298–5307.
306. P.C. Taylor, E.C. Keystone, D.V. Der Heijde, et al., Baricitinib versus placebo or adalimumab in rheumatoid arthritis, *New Engl. J. Med*. 376 (2017) 652–662.

307. R. Fleischmann, M. Schiff, D.V. Der Heijde, et al., Baricitinib, methotrexate, or combination in patients with rheumatoid arthritis and no or limited prior diseasemodifying antirheumatic drug treatment, *Arthrit. Rheum.* 69 (2017) 506–517.
308. M.C. Genovese, J.M. Kremer, O. Zamani, et al., Baricitinib in patients with refractory rheumatoid arthritis, *New Engl. J. Med.* 374 (2016) 1243–1252.
309. M. Dougados, D.V. Der Heijde, Y.C. Chen, et al., Baricitinib in patients with inadequate response or intolerance to conventional synthetic DMARDs: results from the RA-BUILD study, *Ann. Rheum. Dis.* 76 (2017) 88–95.
310. A. Markham, Baricitinib: first global approval, *Drugs* 77 (2017) 1–8
311. Arribillaga L, Dotor J, Basagoiti M, et al. Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF-beta on pulmonary fibrosis. *Cytokine* 2011;53:327–333.
312. Dotor J, Lopez-Vazquez AB, Lasarte JJ, et al. Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library. *Cytokine* 2007;39:106–115.
313. Gil-Guerrero L, Dotor J, Huibregtse IL, et al. In vitro and in vivo downregulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGFbeta1. *J Immunol* 2008;181:126–135.
314. Gonzalo-Gil E, Criado G, Santiago B, Dotor J, Pablos JL, Galindo M. Transforming growth factor (TGF)-b signalling is increased in rheumatoid synovium but TGF-b blockade does not modify experimental arthritis. *Clin Exp Immunol* 2013;174:245–255.
315. Zarranz-Ventura J, Fernandez-Robredo P, Recalde S, et al. Transforming growth factor-beta inhibition reduces progression of early choroidal neovascularization lesions in rats: P17 and P144 peptides. *PLoS One* 2013; 8:e65434.
316. Recalde S, Zarranz-Ventura J, Fernandez-Robredo P, et al. Transforming growth factor-b inhibition decreases diode laser-induced choroidal neovascularization development in rats: P17 and P144 peptides. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7090–7097.
317. Sevilla P, Vining KV, Dotor J, Rodriguez D, Gil FJ, Aparicio C. Surface immobilization and bioactivity of TGF-b1 inhibitor peptides for bone implant applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2016;104: 385–394.

318. Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, Hu GH, Hong SL, Bachert C Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling. *Allergy*. 2012 Oct;67(10):1193-202. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02880.x. Epub 2012 Aug 23.
319. Saito A, Horie M, Micke P, Nagase T The Role of TGF- $\beta$  Signaling in Lung Cancer Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 15;19(11). pii: E3611. doi: 10.3390/ijms19113611
320. Karagiannidis C, Velehroschi V, Obertriffter B, Macha HN, Linder A, Freitag L. High-level expression of matrix-associated transforming growth factor-beta1 in benign airway stenosis. *Chest* 2006;129:1298e304.
321. Li LH, Xu MP, Gan LM, et al. Effect of Low Dose Erythromycin on the Proliferation of Granulation Tissue After Tracheal Injury. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2017;97(10):777-781. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.10.012
322. Zhou L, Li Y, Gan LM, et al. Effects of Different Drugs on Bronchial Stenosis by TGF- $\beta$ /mTOR Signaling Pathway in Rabbit Model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2019;99(24):1898-1903. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.24.012
323. Hoang LL, Nguyen YP, Aspeé R, Bolton SJ, Shen YH, Wang L, Kenyon NJ, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Temporal and Spatial Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$  after Airway Remodeling to Tobacco Smoke in Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 Jun;54(6):872-81. doi: 10.1165/rcmb.2015-0119OC.
324. Takizawa, H.; Tanaka, M.; Takami, K.; Ohtoshi, T.; Ito, K.; Satoh, M.; Okada, Y.; Yamasawa, F.; Nakahara, K.; Umeda, A. Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001, 163, 1476–1483.
325. Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*. 2005;203(2):447-456.
326. Yang T, Liang Y, Lin Q, et al. miR-29 mediates TGF $\beta$ 1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2013;114(6):1336-1342.
327. Nigdelioglu R, Hamanaka RB, Meliton AY, et al. Transforming Growth

- Factor (TGF)- $\beta$  Promotes de Novo Serine Synthesis for Collagen Production. *J Biol Chem.* 2016;291(53):27239-27251.
328. Enyuan Q, Mingpeng X, Luoman G, Jinghua G, Yu L, Wentao L, Changchun H, Lihua L, Xiaoyan M, Lei Z, Guangnan L. Erythromycin combined with corticosteroid reduced inflammation and modified trauma-induced tracheal stenosis in a rabbit model. *Ther Adv Respir Dis.* 2018 Jan-Dec 2018;12:1753466618773707.
329. Carthy JM. TGF $\beta$  signaling and the control of myofibroblast differentiation: Implications for chronic inflammatory disorders. *J Cell Physiol.* 2018;233(1):98-106. doi:10.1002/jcp.25879
330. Vallée A, Lecarpentier Y. TGF- $\beta$  in fibrosis by acting as a conductor for contractile properties of myofibroblasts. *Cell Biosci.* 2019; 9: 98. Published online 2019 Dec 9. doi: 10.1186/s13578-019-0362-3
331. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul 1; 122(1): 103–111.
332. Wang H, Leinwand L.A, Anseth K.S. Roles of transforming growth factor- $\beta$ 1 and OB-cadherin in porcine cardiac valve myofibroblast differentiation *FASEB J.* 2014 Oct;28(10):4551-62.
333. Roy, S. G., Y. Nozaki, and S. H. Phan. 2001. Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:723–734.
334. Hautmann, M. B., C. S. Madsen, and G. K. Owens. 1997. A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J. Biol. Chem.* 272:10948–10956.
335. Han K, Zhang Y, Yang Z Cilostazol protects rats against alcohol-induced hepatic fibrosis via suppression of TGF- $\beta$ 1/CTGF activation and the cAMP/Epac1 pathway. *Exp Ther Med.* 2019 Mar;17(3):2381-2388.
336. Chen JQ, Guo YS, Chen Q, Cheng XL, Xiang GJ, Chen MY, Wu HL, Huang QL, Zhu PL, Zhang JC. TGF $\beta$ 1 and HGF regulate CTGF expression in human atrial fibroblasts and are involved in atrial remodelling in patients with rheumatic



heart disease. *J Cell Mol Med*. 2019 Apr;23(4):3032-3039.

337. Cheong ML, Lai TH, Wu WB. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor  $\beta$ -induced collagen expression in human endometrial stromal cells. *PLoS One*. 2019 Jan 29;14(1):e0210765.

338. Shieh JM, Tsai YJ, Chi JC, Wu WB. TGF $\beta$  mediates collagen production in human CRSsNP nasal mucosa-derived fibroblasts through Smad2/3-dependent pathway and CTGF induction and secretion. *J Cell Physiol*. 2019 Jul;234(7):10489-10499.

339. Nakai K, Karita S, Igarashi J, Tsukamoto I, Hirano K, Kubota Y. COA-CI prevented TGF- $\beta$ 1-induced CTGF expression by Akt dephosphorylation in normal human dermal fibroblasts, and it attenuated skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci*. 2019 Mar 12. pii: S0923-1811(19)30062-3.

340. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996;107:404–411.

341. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Sep;8(3):171-9.

342. Leask A, Abraham DJ. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol*. 2003 Dec;81(6):355-63.

343. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, et al. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(5):1523-1532.

344. Qi W, Twigg S, Chen X, Polhill TS, Poronnik P, Gilbert RE, Pollock CA: Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F800–F809.

345. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K: Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999;181:153–159.

346. Wahab NA, Weston BS, Mason RM: Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res*

2005;307:305–314.

347. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000;275(20):15220-15225.

348. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(10):1805-1819.

349. Roach KM, Wulff H, Feghali-Bostwick C, Amrani Y, Bradding P. Increased constitutive  $\alpha$ SMA and Smad2/3 expression in idiopathic pulmonary fibrosis myofibroblasts is KCa3.1-dependent. *Respir Res*. 2014;15(1):155. Published 2014 Dec 5.

350. Hu B, Wu Z, Phan SH. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(3 Pt 1):397-404.

351. Zhao J, Shi W, Wang YL, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(3):L585-L593.

352. Marshak G, Doyle WJ, Bluestone CD. Canine model of subglottic stenosis secondary to prolonged endotracheal intubation. *Laryngoscope*. 1982 Jul;92(7 Pt 1):805-9.

353. Su, Z., Li, S., Zhou, Z. et al. A canine model of tracheal stenosis induced by cuffed endotracheal intubation. *Sci Rep* 7, 45357 (2017).

354. Vaidergorn J, Fagundes DJ, Machado AL, et al. Model of extensive and severe tracheal stenosis in dogs. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2008 Nov-Dec;23(6):497-500.

355. Ghosh A, Leahy KP, Singhal S, Einhorn E, Howlett P, Cohen NA, Mirza N. A murine model of subglottic granulation. *J Laryngol Otol*. 2016 Apr;130(4):380-7.

356. Saravanam P. Kumar, Arunchalam Ravikumar and J. Thanka, An animal model for laryngotracheal injuries: An experimental study, *The Laryngoscope*, 125, 1, (E23-E27), (2014).

357. Nakagishi Y, Morimoto Y, Fujita M, et al. Rabbit model of airway stenosis

- induced by scraping of the tracheal mucosa. *Laryngoscope* 2005; 115:1087-92.
358. Mady LJ, Criado M, Park J, et al. Subglottic Stenosis: Development of a Clinically Relevant Endoscopic Animal Model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;162(6):905-913. doi:10.1177/0194599820921404
359. McIlwain WR, Wistermayer PR, Swiss TP, Marko ST, Ieronimakis NM, Rogers DJ. Reproducing severe acute subglottic stenosis in a rabbit model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2017 Dec;103:142-146.
360. Hillel AT, Namba D, Ding D, Pandian V, Elisseeff JH, Horton MR. An in situ, in vivo murine model for the study of laryngotracheal stenosis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Oct;140(10):961-6.
361. Jewett BS, Cook RD, Johnson KL, Logan TC, Shockley WW. Stenting after laryngotracheal reconstruction in a subglottic stenosis model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122:488–494
362. van Boxem TJ, Westerga J, Venmans BJ, Postmus PE, Sutedja TG. Tissue effects of bronchoscopic electrocautery: bronchoscopic appearance and histologic changes of bronchial wall after electrocautery. *Chest* 2000; 117:887–891.
363. Schweiger C, Hart CK, Tabangin ME, Cohen AP, Roetting NJ, DeMarcantonio M, Becker E, Ward JA, de Alarcón A. Development of a survival animal model for subglottic stenosis. *Laryngoscope.* 2019 Apr;129(4):989-994.
364. Lee HS, Kim SW, Oak C, et al. Rabbit model of tracheal stenosis using cylindrical diffuser. *Lasers Surg Med.* 2017;49(4):372-379.
365. Roh JL, Lee YW, Park HT. Subglottic wound healing in a new rabbit model of acquired subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006 Aug;115(8):611-6.
366. Mizokami D, Araki K, Shiotani A. Gene Therapy for Tracheal Stenosis Using Sendai Virus Vector. *Koutou (THE LARYNX JAPAN),* 27, 2, (51), (2015).
367. Kwon OJ, Suh GY, Chung MP, Kim J, Han J, Kim H. Tracheal stenosis depends on the extent of cartilaginous injury in experimental canine model. *Exp Lung Res* 2003; 29:329–338.
368. Lee SS, Shin JH, Woo CW, et al. A new model of tracheal stenosis in dogs using combined bronchoscopic electrocautery and ethanol injection. *J Vasc Interv Radiol.* 2008;19(5):764-769.
369. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K: Anti-sclerotic effect of

- transforming growth factor- antibody in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 1999; 92: 6-13.
370. Yanagita M. Inhibitors/antagonists of the TGF- $\beta$  system in kidney fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* (2012) 27: 3686–3691
371. Ling H, Roux E, Hempel D, Tao J, Smith M, et al. (2013) Transforming Growth Factor  $\beta$  Neutralization Ameliorates Pre-Existing Hepatic Fibrosis and Reduces Cholangiocarcinoma in Thioacetamide-Treated Rats. *PLoS ONE* 8(1): e54499.
372. Ezquerro IJ, Lasarte JJ, Dotor J, Castilla-Cortázar I, Bustosa M, Peñuelas I, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor  $\beta$  type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine* 22 (2003): 12–20.
373. Wang Q, Wang Y, Hyde DM, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Ryan ST, et al. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor  $\beta$  soluble receptor in hamsters. *Thorax* (1999);54:805–812
374. Liu M, Suga M, Maclean AA, St George JA, Souza DW, Keshavjee S. Soluble transforming growth factor-beta type III receptor gene transfection inhibits fibrous airway obliteration in a rat model of Bronchiolitis obliterans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:419–423.
375. Ramirez AM, Takagawa S, Sekosan M, Jaffe HA, Varga J, Roman J. Smad3 deficiency ameliorates experimental obliterative bronchiolitis in a heterotopic tracheal transplantation model. *Am J Pathol*. 2004;165:1223–1232.
376. Bonniaud P, Kolb M, Galt T, et al. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 2004;173(3):2099-2108.
377. Lv ZD, Zhao WJ, Jin LY, et al. Blocking TGF- $\beta$ 1 by P17 peptides attenuates gastric cancer cell induced peritoneal fibrosis and prevents peritoneal dissemination in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2017;88:27-33.
378. Zarranz-Ventura J, Fernández-Robredo P, Recalde S, Salinas-Alamán A, Borrás-Cuesta F, Dotor J, García-Layana A. Transforming growth factor-beta inhibition reduces progression of early choroidal neovascularization lesions in rats: P17 and P144 peptides. *PLoS One*. 2013 May 31;8(5):e65434.
379. Gonzalo E, Criado G, Santiago B, Pablos JL, Galindo M. Selective blockade

- of TGFbeta in the mice model of collagen-induced arthritis. *J Transl Med*. 2011;9(Suppl 2):P34. Published 2011 Nov 23.
380. Simpson CB, White S, McGuff HS. Anti-transforming growth factor beta as a treatment for laryngotracheal stenosis in a canine model. *Laryngoscope* 2008;118(3):546-551
381. Hanafy, N.A.N. Encapsulation of cancer signalling pathway inhibitors as a protective way for healthy cells. *Commentary. Med Res Innov*. 2018
382. Recalde, S.; Zarranz-Ventura, J.; Fernández-Robredo, P.; García-Gómez, P.J.; Salinas-Alamán, A.; Borrás sonCuesta, F.; Dotor, J.; García-Layana, A. Transforming growth factor- $\beta$  inhibition decreases diode laserinduced choroidal neovascularization development in rats: P17 and P144 peptides. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2011, 52, 7090–7097.
383. Qiu, S.S.; Dotor, J.; Hontanilla, B. Effect of P144® (Anti-TGF- $\beta$ ) in an "In Vivo" Human Hypertrophic Scar Model in Nude Mice. *PLoS ONE* 2015, 10, e0144489.
384. Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J.C.; Arnaud, P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull*. 2002, 25, 1600–1603.
385. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med*. 2015;372(12):1138-1149.
386. Burgy O, Königshoff M. The WNT signaling pathways in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*. 2018;68-69:67-80.
387. Carthy JM, Garmaroudi FS, Luo Z, McManus BM. Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF- $\beta$  signaling through SMAD2 in a  $\beta$ -catenin-dependent manner. *PLoS One*. 2011;6(5):e19809.
388. Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. *Pharmacol Res*. 2016;108:57-64.
389. Kim CL, Choi SH, Mo JS. Role of the Hippo Pathway in Fibrosis and Cancer. *Cells*. 2019 May 16;8(5). pii: E468.
390. Borthwick LA, Wynn TA, Fisher AJ. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):1049-1060.
391. Molkenstin JD, Bugg D, Ghearing N, Dorn LE, Kim P, Sargent MA, Gunaje J, Otsu K, Davis J. Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-

Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. *Circulation*. 2017 Aug 8;136(6):549-561.

392. Kim EK, Choi EJ. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol*. 2015 Jun;89(6):867-82.

393. Koga Y, Tsurumaki H, Aoki-Saito H, Sato M, Yatomi M, Takehara K, Hisada T. Roles of Cyclic AMP Response Element Binding Activation in the ERK1/2 and p38 MAPK Signalling Pathway in Central Nervous System, Cardiovascular System, Osteoclast Differentiation and Mucin and Cytokine Production. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 17;20(6). pii: E1346.

394. Malemud CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? *Future Med Chem*. 2015;7(9):1137-47.

395. Lam AP, Herazo-Maya JD, Sennello JA, Flozak AS, Russell S, Mutlu GM, et al. Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190:185–95.

396. Borthwick LA. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. *Semin Immunopathol*. 2016;38(4):517-534.

397. Matthey DL, Dawes PT, Nixon NB, Slater H. Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis*. 1997;56:426–431.

398. Salmon-Ehr V, Serpier H, Nawrocki B, Gillery P, Clavel C, Kalis B, Birembaut P, Maquart FX. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch Dermatol*. 1996;132:802–806.

399. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest*. 1998;101:2129–2139.

400. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Maruoka S, Horie T. IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:1001–1008.

401. Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K, Takizawa H. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy*

Immunol. 2003;132:168–176.

402. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol.* 1991;37:823–829.

403. Cheever AW, Williams ME, Wynn TA, Finkelman FD, Seder RA, Cox TM, Hieny S, Caspar P, Sher A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol.* 1994;153:753–759.

404. Ong C, Wong C, Roberts CR, Teh HS, Jirik FR. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol.* 1998;28:2619–2629.

405. Le Moine A, Flamand V, Demoor FX, Noel JC, Surquin M, Kiss R, Nahori MA, Pretolani M, Goldman M, Abramowicz D. Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection. *J Clin Invest.* 1999;103:1659–1667.

406. Chiamonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest.* 1999;104:777–785.

407. Aliprantis AO, Wang J, Fathman JW, Lemaire R, Dorfman DM, Lafyatis R, Glimcher LH. Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:2827–2830.

408. Kumar RK, Herbert C, Yang M, Koskinen AM, McKenzie AN, Foster PS. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1104–1111.

409. Keane MP, Gomperts BN, Weigt S, Xue YY, Burdick MD, Nakamura H, Zisman DA, Ardehali A, Sagar R, Lynch JP, III, Hogaboam C, Kunkel SL, Lukacs NW, Ross DJ, Grusby MJ, Strieter RM, Belperio JA. IL-13 is pivotal in the fibro-obliterative process of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Immunol.* 2007;178:511–519.

410. Kolodsick JE, Toews GB, Jakubzick C, Hogaboam C, Moore TA, McKenzie A, Wilke CA, Chrisman CJ, Moore BB. Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from

- impaired collagen synthesis by fibroblasts. *J Immunol.* 2004;172:4068–4076.
411. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 1999;103:779–788.
412. Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, Neben TY, Finnerty H, Henderson SL, O'Hara RM, Jr, Beier DR, Turner KJ, Wood CR, Collins M. The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol.* 1998;161:2317–2324.
413. Chiaramonte MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, Wynn TA. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology.* 2001;34:273–282.
414. Taube C, Duez C, Cui ZH, Takeda K, Rha YH, Park JW, Balhorn A, Donaldson DD, Dakhama A, Gelfand EW. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol.* 2002;169:6482–6489.
415. Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboam CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol.* 2001;166:5219–5224.
416. Gharaee-Kermani M, Phan SH. Lung interleukin-5 expression in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:438–447.
417. Ochkur SI, Jacobsen EA, Protheroe CA, Biechele TL, Pero RS, McGarry MP, Wang H, O'Neill KR, Colbert DC, Colby TV, Shen H, Blackburn MR, Irvin CC, Lee JJ, Lee NA. Coexpression of IL-5 and eotaxin-2 in mice creates an eosinophil-dependent model of respiratory inflammation with characteristics of severe asthma. *J Immunol.* 2007;178:7879–7889.
418. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE., Jr Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2008;133:226–232.
419. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, Wynn TA. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med.* 2010;207:535–552.
420. Ivanov BS, II, McKenzie L, Zhou CE, Tadokoro A, Lepelley JJ, Lafaille DJ,



- Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 2006;126:1121–1133.
421. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol*. 2010;185:2502–2515.
422. Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, Srinivasan S, Bedja D, Zheng D, Gabrielson K, Iwakura Y, Rose NR, Cihakova D. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 2010;106:1646–1655.
423. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene*. 2017;614:1–7.
424. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med*. 2018;62:44–62.
425. Oh, S., Kurz, H., Christ, B. et al. Platelet-derived growth factor-B induces transformation of fibrocytes into spindle-shaped myofibroblasts in vivo. *Histochemistry* 109, 349–357 (1998).
426. Lee JI, Wright JH, Johnson MM, et al. Role of Smad3 in platelet-derived growth factor-C-induced liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;310(6):C436–C445.
427. Charni Chaabane S, Coomans de Brachène A, Essaghir A, et al. PDGF-D expression is down-regulated by TGF $\beta$  in fibroblasts. *PLoS One*. 2014;9(10):e108656. Published 2014 Oct 3.
428. Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, et al. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol*. 2004;173(6):4020–4029.
429. Ma LJ, Yang H, Gaspert A, et al. Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice. *Am J Pathol*. 2003;163(4):1261–1273.
430. Pokharel RP, Maeda K, Yamamoto T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in exuberant tracheal granulation tissue in children *J Pathol* 1999;188:82–86.

431. Wen FQ, Liu X, Manda W, et al. TH2 cytokine-enhanced and TGF-betaenhanced vascular endothelial growth factor production by cultured human airway smooth muscle cells is attenuated by IFN-gamma and corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1307–1318.
432. Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF- $\beta$ 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(4):a022293. Published 2018 Apr 2.
433. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases. *J Clin Med.* 2016;5:45.
434. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8:931–937.
435. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132:27–42.
436. Nam SA, Kim WY, Kim JW, Park SH, Kim HL, Lee MS, Komatsu M, Ha H, Lim JH, Park CW, Yang CW, Kim J, Kim YK. Autophagy attenuates tubulointerstitial fibrosis through regulating transforming growth factor- $\beta$  and NLRP3 inflammasome signaling pathway. *Cell Death Dis.* 2019 Jan 28;10(2):78.
437. Qin EY, Gan LM, Gan JH, et al. Expression and Significance of Autophagy in Rabbit Model of Tracheal Stenosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2017;97(48):3816-3820.
438. MacFarlane EG, Haupt J, Dietz HC, Shore EM. TGF- $\beta$  Family Signaling in Connective Tissue and Skeletal Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(11):a022269. Published 2017 Nov 1.
439. Albro MB, Nims RJ, Cigan AD, et al. Accumulation of exogenous activated TGF- $\beta$  in the superficial zone of articular cartilage. *Biophys J.* 2013;104(8):1794-1804.
440. Wang W, Rigueur D, Lyons KM. TGF $\beta$  signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(1):37-51.
441. Albro MB, Nims RJ, Durney KM, et al. Heterogeneous engineered cartilage growth results from gradients of media-supplemented active TGF- $\beta$  and is ameliorated by the alternative supplementation of latent TGF- $\beta$ . *Biomaterials.* 2016;77:173-185.
442. Keller B, Yang T, Chen Y, et al. Interaction of TGF $\beta$  and BMP signaling

- pathways during chondrogenesis. PLoS One. 2011;6(1):e16421. Published 2011 Jan 28.
443. Tekari A, Luginbuehl R, Hofstetter W, Egli RJ. Transforming growth factor beta signaling is essential for the autonomous formation of cartilage-like tissue by expanded chondrocytes. PLoS One. 2015;10(3):e0120857. Published 2015 Mar 16.
444. Taylor PC. Clinical efficacy of launched JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2019;58(Suppl 1):i17-i26.
445. Papp KA, Menter MA, Raman M, et al. A randomized phase 2b trial of baricitinib, an oral Janus kinase (JAK) 1/JAK2 inhibitor, in patients with moderate-to-severe psoriasis. Br J Dermatol. 2016;174(6):1266-1276.
446. Wallace DJ, Furie RA, Tanaka Y, Kalunian KC, Mosca M, Petri MA, et al. Baricitinib for systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet. 2018;392:222–31.
447. Shi JG, Chen X, Lee F, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of baricitinib, an oral JAK 1/2 inhibitor, in healthy volunteers. J Clin Pharmacol. 2014;54(12):1354-1361.
448. Kim H, Brooks KM, Tang CC, et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Proposed Dosing of the Oral JAK1 and JAK2 Inhibitor Baricitinib in Pediatric and Young Adult CANDLE and SAVI Patients. Clin Pharmacol Ther. 2018;104(2):364-373.
449. McInnes IB, Byers NL, Higgs RE, et al. Comparison of baricitinib, upadacitinib, and tofacitinib mediated regulation of cytokine signaling in human leukocyte subpopulations. Arthritis Res Ther. 2019;21(1):183. Published 2019 Aug 2.
450. Boyle DL, Soma K, Hodge J, et al. The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2015;74(6):1311-1316.

## **13 ANEXO**

### **13.1 ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

**$\alpha$ -SMA:**  $\alpha$ -actina muscular lisa (smooth muscle actine)

**a.C.** Antes de cristo (**acrónimo**)

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**atm:** atmosferas

**BALT:** tejido linfoide asociado a bronquio

**BMP:** Bone Morphogenetic Protein

**°C:** grados centígrados

**CA:** california (EEUU)

**CDK:** quinasas dependientes de ciclina

**cm:** centímetros

**CTGF:** Factor de crecimiento de tejido conectivo

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**DAB:** diaminobenzidina

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EEUU:** estados unidos

**ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares

**ET:** endotelina

**ETC:** estenosis traqueal congénita

**FiO<sub>2</sub>:** fracción inspirada de oxígeno

**IC<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria máxima media

**IHC:** inmunohistoquímica

**IL:** interleukina

**im:** intramuscular

**IN:** Indiana (EE.UU.)

**INF:** interferon

**IV:** intravenoso/a

**JAK:** de "*just another kinase*"

**JNK:** quinasas c-Jun N-terminal

**KDa:** kilodalton

**Kg:** kilogramo

**KTP** titanil fosfato de potasio

**kV:** kilovoltio

**L:** litro

**Laser:** Light Amplified Stimulated Emission of Radiation

**LTBP:** latent TGF- $\beta$  binding proteins

**MA:** Massachusetts (EE.UU.)

**MAPK:** Protein-kinasas Mitógenas

**MCP:** proteína quimiotáctica de monocitos (*Monocyte Chemoattractant Protein*)

**mg:** miligramo

**ml:** mililitro

**mm:** milímetro

**mm<sup>2</sup> :** milímetro cuadrado

**mmHg:** milímetro de mercurio

**mM:** milimol

**MO:** Montana (EE.UU.)

**mTOR:** de “*Mammalian target of Rapamycin*”

**Nd YAG:** neodymium-doped yttrium aluminium garnet

**NJ:** Nueva Jersey (EE.UU.)

**NK:** natural killer

**nm:** nanómetros

**nmol:** nanomol

**PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno-1

**PBS:** tampón fosfato-salino (*phosphate-buffered saline*)

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PDS:** Polidioxanona

**PFA:** paraformaldehído

**PGE2:** prostaglandina E2

**PI3K:** fosfatidilinositol-3-kinasa

**PPAR $\gamma$** : receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

**Psi:** libras por pulgada cuadrada

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**SBE:** smad binding element

**Smad:** proteína cuyo nombre proviene de la contracción del nombre de dos proteínas. MAD *Mothers Against Decapaplegic* y SMA *small body size*

**STAT:** signal transducer and activator of transcription

**TAC:** tomografía axial computerizada

**TAK1** (o MAP3K7): proteína quinasa quinasa activada por mitógenos quinasa 7

**TGF:** Transforming Growing Factor

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**$\mu$ l:** microlitro

**VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial

**YAP** Itrio aluminio fósforo

## **13.2. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

### **INDICE DE TABLAS**

**Tabla 1:** *Tipos de endoprótesis y sus potenciales beneficios e inconvenientes.*

**Tabla 2:** *Anticuerpos primarios.*

**Tabla 3:** *Anticuerpos secundarios.*

### **INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1:** *Representación molecular de TGF- $\beta$ .*

**Figura 2.** *Ruta de señalización mediada por TGF- $\beta$ .*

**Figura 3.** *Descripción general del mecanismo de regulación de la vía JAK / STAT.*

**Figura 4.** *Posición del espécimen.*

**Figura 5.** *Cervicotomía y acceso a la tráquea cervical del espécimen.*

**Figura 6.** *Incisión trasversa de la tráquea y acceso a la luz traqueal.*

**Figura 7.** *Realización de la lesión térmica circunferencial de la mucosa traqueal.*

**Figura 8.** *Colocación de la esponja de lipogel sobre la incisión traqueal.*

**Figura 9.** *Fijación de esponja de lipogel sobre la incisión traqueal.*

**Figura 10.** *Análisis histológico (Masson) y cuantitativo de área de colágeno en secciones traqueales humanas.*

**Figura 11.** *Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo de la expresión de CTGF y  $\alpha$ -SMA en secciones traqueales humanas.*

**Figura 12.** *Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo de la expresión de p-Smad2/3 en secciones traqueales humanas.*

**Figura 13.** *Comparativa de sección traqueal entre controles y casos del modelo animal de estenosis traqueal.*

**Figura 14.** *Análisis histológico (Masson) y cuantitativo de área de colágeno en secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal.*

**Figura 15.** *Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo de la expresión de CTGF y  $\alpha$ -SMA en secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal.*

**Figura 16.** *Análisis morfológico y cuantitativo de porcentaje de luz traqueal entre secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal, tratadas con p17 y control.*

**Figura 17.** *Análisis histológico (Masson) y cuantitativo de área de colágeno entre secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal, tratadas con p17 y control.*

**Figura 18.** *Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo de la expresión de  $\alpha$ -SMA entre secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal, tratadas con p17 y control.*

**Figura 19.** *Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo de la expresión de CTGF entre secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal, tratadas con p17 y control.*

**Figura 20.** *Análisis histológico del cartílago traqueal (Safranina) entre secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal, tratadas con p17 y control.*

**Figura 21.** *Análisis inmunohistoquímico y cuantitativo de la expresión de p-STAT en secciones traqueales humanas de estenosis traqueal y modelo animal de estenosis traqueal*

**Figura 22.** *Análisis histológico y cuantitativo de porcentaje de luz traqueal, porcentaje de área de colágeno y engrosamiento traqueal entre secciones traqueales del modelo animal de estenosis traqueal, tratadas con Baricitinib y controles.*



### 13.3. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Parte del contenido de esta tesis ha sido publicado en *The Laryngoscope* con la siguiente referencia: Antón-Pacheco, J.L., Usategui, A., Martínez, I. et al. TGF- $\beta$  antagonist attenuates fibrosis but not luminal narrowing in experimental tracheal stenosis. *The Laryngoscope*, 127: 561-567. doi:[10.1002/lary.26402](https://doi.org/10.1002/lary.26402)

También se ha comunicado parcialmente el contenido de esta tesis por parte del autor en diversos congresos científicos

- International Joint Meeting of Thoracic Surgery (Barcelona. 2015): prophylactic antifibrotic effectiveness of p17, an antagonist of TGF- $\beta$  in an animal model of tracheal stenosis
- 8º Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT) 2017: Activación de la vía Jak/STAT3 en lesiones estenóticas traqueales humanas.
- 50 congreso Sociedad Española de Patología de Aparato Respiratorio (SEPAR) Junio 2018 “Estudio del papel del péptido antagonista de TGF- $\beta$ 1, p17, en el desarrollo de estenosis traqueal en un modelo animal”

#### **Premiada con comunicación SEPAR ORO**

El autor también ha realizado una cotutela de Trabajo de Fin de Grado Máster para alumnos de 6º curso de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid con el título: *Estudio del papel del péptido antagonista de TGF- $\beta$ 1, p144, en el desarrollo de estenosis traqueal en un modelo animal*”, con reconocimiento de 10 horas de dedicación docente.